

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4644486号
(P4644486)

(45) 発行日 平成23年3月2日(2011.3.2)

(24) 登録日 平成22年12月10日(2010.12.10)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/165 (2006.01)

C O 7 K 14/165

C O 7 K 16/10 (2006.01)

C O 7 K 16/10

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 53 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-523905 (P2004-523905)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月1日(2003.7.1)
 (65) 公表番号 特表2005-533513 (P2005-533513A)
 (43) 公表日 平成17年11月10日(2005.11.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/002832
 (87) 国際公開番号 W02004/011651
 (87) 国際公開日 平成16年2月5日(2004.2.5)
 審査請求日 平成18年5月10日(2006.5.10)
 (31) 優先権主張番号 0217434.0
 (32) 優先日 平成14年7月27日(2002.7.27)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

微生物の受託番号 NCIMB 41146

(73) 特許権者 505033743
 ザ ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ
 イギリス, ロンドン エヌダブリュ1
 Oティーユー, ロイヤル カレッジ ス
 トリート, ユニヴァーシティ オブ ロ
 ンドン
 (74) 復代理人 100127052
 弁理士 福岡 睦
 (74) 代理人 100090033
 弁理士 荒船 博司
 (74) 代理人 100093045
 弁理士 荒船 良男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌ呼吸器コロナウイルス (CRCV) のスパイクタンパク、ポリメラーゼ及び血球凝集素/エステラーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原性若しくは免疫原性のあるコロナウイルススパイク (S) タンパクであって、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列のイヌ呼吸器コロナウイルス (CRCV) の S タンパクと少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有するコロナウイルス S タンパク、又は、少なくとも 200 個の長さのアミノ酸である、前記コロナウイルス S タンパクの抗原性若しくは免疫原性のある断片であって、前記コロナウイルス S タンパク又は前記断片は表 1 に示す CRCV 特異的アミノ酸の少なくとも 4 を有する、コロナウイルス S タンパク又はその断片。

【請求項 2】

配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するコロナウイルス S タンパク、又は前記コロナウイルス S タンパクの抗原性若しくは免疫原性のある変体であって配列番号 4 に示す配列と少なくとも 97 % のアミノ酸配列同一性を持つ変体。

【請求項 3】

配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 98 % の同一性を有する、請求項 1 又は 2 に記載のコロナウイルスの S タンパク。

【請求項 4】

配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 99 % の同一性を有する、請求項 1 又は 2 に記載のコロナウイルスの S タンパク。

【請求項 5】

10

20

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパクをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの相補物。

【請求項 6】

配列番号 3 に示す核酸配列を有する、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチドを有するベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターを有する宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 7 に記載のベクターによりコードされるタンパクを得る方法であって、請求項 8 に記載の宿主細胞を培養する工程と、前記宿主細胞で前記タンパクを発現させる工程と、前記タンパクを精製する工程と、を有する方法。

10

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法によって得ることができるタンパク。

【請求項 11】

前記ベクターは前記ポリヌクレオチドに作用するように結合された真核生物のプロモーターを有する発現ベクターであり、前記宿主細胞は真核生物の宿主細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチドによりコードされるグリコシル化 S タンパクを得る方法であって、前記方法は、請求項 11 の宿主細胞を培養する工程と、前記宿主細胞において前記タンパクを発現させる工程と、前記タンパクを精製する工程と、を有する方法。

20

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法によって得ることができるグリコシル化 S タンパク。

【請求項 14】

抗 C R C V 抗体を作製する方法であって、(i) 動物において請求項 1 又は 2 に記載の S タンパクに対する免疫応答を起こさせて、前記動物又は前記動物由来の不死細胞から抗体を調製する工程、又は (ii) 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の S タンパクを用いて抗体ディスプレイライブラリから抗体を選択する工程を有する方法。

30

【請求項 15】

前記抗体のアフィニティーがウシコロナウィルス (B C V) の S タンパクに対してよりも C R C V の S タンパクに対して強いかどうかを判別する工程をさらに有する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

イヌが C R C V に曝されたかどうかを判別する方法であって、

(a) 前記イヌから好適な試料を得る工程と、

(b) 前記試料中の C R C V 又は抗 C R C V 抗体を特定する工程と、

を有し、

前記 C R C V を特定する工程は、請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチドを特定する工程、又は請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のコロナウィルス S タンパクを特定する工程を含み、

40

前記抗 C R C V 抗体を特定する工程は、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のコロナウィルス S タンパクに選択的に結合する抗体を特定する工程を含む方法。

【請求項 17】

前記抗 C R C V 抗体は、C R C V、B C V 又はヒトコロナウィルス (H C V) の抗原を用いて検出される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記好適な試料は、肺洗液、気管洗液、扁桃腺の綿棒採取標本又はイヌの気道から得た生検もしくは死後の試料である、請求項 16 に記載の方法。

50

【請求項 19】

請求項 1～4 のいずれかに記載のコロナウイルス S タンパクを特定する工程は C R C V と反応する抗体を用いる工程を有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 C R C V に反応する抗体は、抗 B C V 抗体、抗 H C V 抗体、又は請求項 15 に記載の方法によって調製された抗 C R C V 抗体である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

抗 C R C V の S タンパク抗体を検出するための免疫吸着検定デバイスであって、

請求項 1、2、10 及び 13 のいずれかに記載の S タンパク又は抗原性 S タンパク断片でコートされた固相であって、前記固相に曝された試料中の抗 C R C V の S タンパク抗体は前記 S タンパク又は前記 S タンパク断片に結合可能である固相と、

前記固相に結合した前記抗 C R C V の S タンパク抗体と結合可能であって、抗イヌ抗体を含む、検出可能な標識複合体と、を含むデバイス。

【請求項 22】

前記固相はマイクロタイターウェルである、請求項 21 に記載の免疫吸着検定デバイス。

【請求項 23】

前記複合体は酵素を有する、請求項 21 又は 22 に記載の免疫吸着検定デバイス。

【請求項 24】

前記酵素はホースラディッシュペルオキシダーゼである、請求項 23 に記載の免疫吸着検定デバイス。

【請求項 25】

前記酵素の基質をさらに有する、請求項 23 又は 24 に記載の免疫吸着検定デバイス。

【請求項 26】

請求項 1、2、10 及び 13 のいずれかに記載の S タンパク又は抗原性 S タンパク断片を付着させた、液体試料から抗 C R C V の S タンパク抗体を捉えるための固体基質であって、前記固体基質に曝された試料中の抗 C R C V の S タンパク抗体は前記 S タンパクに結合する、固体基質。

【請求項 27】

前記固体基質はマイクロタイターウェルである、請求項 26 に記載の固体基質。

【請求項 28】

イヌに免疫するためのワクチン構成物であって、
配列番号 4 のアミノ酸配列の C R C V の S タンパクと少なくとも 97 % のアミノ酸配列同一性を有する免疫原性のある S タンパクを持つコロナウイルス、又は、
配列番号 4 のアミノ酸配列の C R C V の S タンパクと少なくとも 97 % のアミノ酸配列同一性を有する免疫原性のあるコロナウイルス S タンパク、又は少なくとも 200 個の長さのアミノ酸配列を有し、表 1 に示す C R C V 特異的アミノ酸の少なくとも 4 を有する、前記コロナウイルス S タンパクの免疫原性のある断片、又は前記コロナウイルス S タンパクもしくは前記断片をコードする核酸を有する、ワクチン構成物。

【請求項 29】

前記コロナウイルス S タンパクは、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 98 % の同一性を有する、請求項 28 に記載のワクチン構成物。

【請求項 30】

前記コロナウイルス S タンパクは、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 99 % の同一性を有する、請求項 29 に記載のワクチン構成物。

【請求項 31】

請求項 28 に記載のワクチン構成物であって、請求項 1、2、10 及び 13 のいずれかに記載の S タンパク、又は少なくとも 200 個の長さのアミノ酸配列を有し、表 1 に示す C R C V 特異的アミノ酸の少なくとも 4 を有する、前記 S タンパクの免疫原性のある断片を有する、ワクチン構成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

請求項 2 8 ～ 3 1 のいずれか一項に記載のワクチン構成物であって、前記コロナウイルス S タンパクは単離されたタンパク又は組み換えタンパクである、ワクチン構成物。

【請求項 3 3】

医薬として使用可能なアジュバントをさらに有する、請求項 2 8 から 3 2 のいずれかに記載のワクチン構成物。

【請求項 3 4】

請求項 2 8 から 3 3 のいずれかに記載のワクチン構成物であって、

(a) イヌにおいてイヌパラインフルエンザウイルス (C P I V) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

(b) イヌにおいてイヌアデノウイルス 2 型 (C A V - 2) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

(c) イヌにおいてイヌヘルペスウイルス (C H V) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

(d) イヌにおいて *Bordetella bronchiseptica* (B. bronchiseptica) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

のいずれか 1 以上をさらに有するワクチン構成物。

【請求項 3 5】

イヌにおける C R C V に対する免疫応答を刺激するための薬剤の調製における使用であって、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の S タンパクを持つコロナウイルスの使用、又は請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の免疫原性のあるコロナウイルス S タンパクもしくは S タンパク断片、又は前記コロナウイルス S タンパクもしくは 前記断片 をコードする核酸の使用。

【請求項 3 6】

イヌにおける呼吸器疾患の予防のための薬剤の調製における使用であって、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の S タンパクを持つコロナウイルスの使用、又は請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の免疫原性のあるコロナウイルス S タンパクもしくは S タンパク断片、又は前記コロナウイルス S タンパクもしくは 前記断片 をコードする核酸の使用。

【請求項 3 7】

前記コロナウイルス S タンパクは、C R C V の S タンパクである、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

【請求項 3 8】

前記コロナウイルス S タンパクは、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の前記 C R C V タンパクと少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

【請求項 3 9】

前記 S タンパクは請求項 9 又は 1 2 の方法によって調製された、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

【請求項 4 0】

前記コロナウイルスは不活化又は弱毒化されている、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

【請求項 4 1】

医薬としての使用のための、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のコロナウイルス S タンパク。

【請求項 4 2】

単離されたタンパク又は組み換えタンパクである、請求項 4 1 に記載の使用のためのコロナウイルス S タンパク。

【請求項 4 3】

イヌの間での C R C V の蔓延と闘う方法であって、イヌが C R C V に感染しているかどうかを請求項 1 6 から 2 0 のいずれかに記載の方法によって判別する工程と、前記イヌが

10

20

30

40

50

C R C Vに感染しているのであれば前記イヌを隔離する工程と、を有する方法。

【請求項 4 4】

イヌの間でのC R C Vの蔓延と闘う方法であって、イヌがC R C Vに感染しているかどうかを請求項 1 6 から 2 0 のいずれかに記載の方法によって判別する工程と、前記イヌがC R C Vに感染しているのであれば、前記イヌと接していた、接している、又は接しているかもしれない他のイヌに予防接種する工程と、を有する方法。

【請求項 4 5】

挿入部分がC R C VのSのc D N Aの一部を含むプラスミドを含有するS p i k e D - 1 C R C V系統の大腸菌であって、2 0 0 2年7月25日にザロイヤルヴェテリネリカレッジによりN C I M Bに寄託されたアクセス番号N C I M B 4 1 1 4 6の大腸菌。

10

【請求項 4 6】

2 0 0 2年7月25日にザロイヤルヴェテリネリカレッジによりN C I M Bに寄託されたアクセス番号N C I M B 4 1 1 4 6であるS p i k e D - 1 C R C V系統の大腸菌に含まれるプラスミド。

【請求項 4 7】

請求項 2 1 から 2 5 のいずれかに記載の免疫吸着検定デバイスのためのキットであって、固相と、固相をコーティングするための請求項 1、2、1 0 及び 1 3 のいずれかに記載のコロナウイルスSタンパクと、抗イヌ抗体を有する検出可能な標識複合体と、を有するキット。

【請求項 4 8】

20

前記固相はマイクロタイタープレートを有する、請求項 4 7 に記載のキット。

【請求項 4 9】

前記検出可能な標識複合体は酵素をさらに有する、請求項 4 7 又は 4 8 に記載のキット。

【請求項 5 0】

前記酵素に対する基質をさらに有する請求項 4 9 に記載のキット。

【請求項 5 1】

抗C R C VのSタンパク抗体を含有するポジティブコントロール試料をさらに有する、請求項 4 7 から 5 0 のいずれかに記載のキット。

【請求項 5 2】

30

イヌをC R C Vに対して受動的に免疫する薬剤の調製における、請求項 1 4 又は 1 5 に記載の方法によって調製された抗体の使用。

【請求項 5 3】

C I R Dの診断方法であって、請求項 1 6 から 2 0 のいずれかに規定される方法によってイヌがC R C Vに曝されたかどうかを判別する工程を有する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は生物材料に関し、特にイヌ感染性呼吸器疾患のイヌが持つイヌ呼吸器コロナウイルスに関する。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

イヌ感染性呼吸器疾患（C I R D）は、救助施設（re-homing center）や宿泊所または訓練施設などの過密な状況で飼育されるイヌによく見られる高い伝染性を有する病気である。多くのイヌは弱い咳のみを呈し短期間で回復するが、中には重い気管支炎に発展する場合もある（Appel and Binn, 1987）。

【0 0 0 3】

C I R Dの病因は多岐にわたると考えられており、数種のウイルスやバクテリアが含まれる。感染性のある、C I R Dの原因となる主な病原体としては、イヌパラインフルエンザウイルス（C P I V）（Binn et al., 1967）、イヌアデノウイルス2型（C A V - 2

50

) (Ditchfield et al., 1962)、及びバクテリアのBordetella bronchiseptica (Bemis et al., 1977, Keil et al., 1998) が考えられている。また、イヌヘルペスウイルス、ヒトレオウイルス及びマイコプラズマ類がC I R Dの症状を示すイヌから単離されている (Karpas et al., 1968, Lou and Wenner 1963, Randolph et al., 1993)。ストレス等のその他の要素もまた重要となるかもしれない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

C I R Dが致命的となることは希であるが、C I R Dにより相当な治療費用がかかるだけでなく、イヌが救助施設から家に戻るのが遅くなったり、訓練施設でのスケジュールが乱れたりする。

10

【0005】

この病気に関する病原体のいくつか、すなわちC P I V及びC A V-2並びにBordetella bronchisepticaについては、ワクチンが利用可能である。しかしながら、こうしたワクチンの利用にもかかわらず、C I R Dは依然として世界規模で飼育施設において流行している。これは、おそらくワクチンがC I R Dに含まれるすべての病原体に対する予防作用をもたらすものではないためと考えられる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

我々は、特有な呼吸器疾患の経歴がある大規模なイヌ飼育施設において新規なコロナウイルスを発見し、イヌ呼吸器コロナウイルス (C R C V) と命名した。そして、このウイルスがC I R Dに関連することを示した。

20

【0007】

コロナウイルス科のファミリーのいくつかは、ヒト、ウシ、ブタ及び家禽の呼吸器疾患の原因となることが知られている (Makela et al., 1998, Pensaert et al., 1986, Ignjatovic and Sapats 2000)。例えば、ウシ呼吸器コロナウイルスは多因性の呼吸器疾患であるウシの輸送熱に関連している (Storz et al., 2000)。

【0008】

しかしながら、コロナウイルスはC I R Dの病因の一因として疑われていなかった。実際、たったひとつの例外を除いて、イヌコロナウイルスは腸性ウイルスであり、主に若いイヌにおける急性の下痢の原因であると報告されている (例えばTennant et al., 1993)。大規模なイヌ呼吸器疾患に関連するウイルスの研究において、Binnら(1979)は一匹のイヌの肺からイヌコロナウイルスをしたが、そのイヌはS V 5及びイヌアデノウイルス2型にも感染しており、イヌコロナウイルスの他に2種のウイルスを伴っていた。

30

【0009】

イギリスでは、神経、腸性、肝臓及び呼吸器等の疾患の原因となる種々の病原体に対する30~40のイヌワクチンが市販されている。これらのワクチンのほとんどは、ジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパルボウイルス、イヌパラインフルエンザウイルス、並びにLeptospira canicola及びL. icterohaemorrhagiaeなどの微生物試薬を含有している。これらのワクチンのいずれもイヌコロナウイルスを含有していない。

40

【0010】

イヌ呼吸器疾患に用いられるイヌワクチンは、“ケンネルコフ”用のワクチンとして市販されている (下記参照)。そうしたワクチンはすべて“ケンネルコフ”に関連するバクテリアであるBordetella bronchisepticumを含有している。

【0011】

Coyne M.J. 及び May S.W., (1995)は、著書"Considerations in using a canine coronavirus vaccine" (published as a Pfizer Technical Bulletin on the Internet at <http://www.pfizer.com/ah/vet/tref/trbull/ccv.html>)の中で、イヌコロナウイルス単体あるいはイヌコロナウイルスとその他に対するワクチンとして市販される20種以上のワクチンを列挙している。これらのワクチンはそれぞれイヌ腸性疾患に対するものであり、

50

イヌコロナウイルスが呼吸器疾患に関連する可能性を示唆するものは無い。

【0012】

Millerらによるファイザー社のUS Patents Nos. 6,057,436 and 6,372,224には、腸性コロナウイルスのスパイク遺伝子と、胃腸性炎のワクチンとしての使用などのその使用について記載されている。これら2つの特許のいずれもイヌコロナウイルスがCIRDに関連する可能性を示唆していない。

【0013】

コロナウイルス科のファミリーは直径80～160nmの被膜ウイルスで、直鎖状プラス鎖RNAゲノムを含む。コロナウイルスの構造タンパクは、スパイク糖タンパク(S)、膜糖タンパク(M)、及びヌクレオカプシドタンパク(N)である。血球凝集素／エステラーゼ糖タンパク(HE)は2属のコロナウイルスの表面でのみ発見されている(例えばウシコロナウイルス及びネズミ肝炎ウイルス)(Spaan et al, 1988)。コロナウイルス類の詳細な構造については、the chapter by Cavanagh et al entitled "Coronaviridae" p407-411, in "Virus Taxonomy, 6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", pub. Springer-Verlag Wein, New York, Eds. Murphy et alに記載されており、これは参照により組み入れられる。

【0014】

本発明のイヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)は、伝染性の呼吸器疾患をもつイヌの呼吸器系に存在するコロナウイルスとして特徴としてもよい。さらにCRCVの特徴として、我々はCRCVポリメラーゼ(pol)cDNAの250残基の塩基配列を決定した(図1及びSEQ ID No. 1)。これはpolタンパクにおける83の部分アミノ酸配列に相当する(図2及びSEQ ID No. 2)。また、我々はCRCVスパイク(S)cDNAの4092残基の塩基配列をクローニング及び決定した(図3及びSEQ ID No. 3)。これは1363のアミノ酸に相当する(図4及びSEQ ID No. 4)。また、我々はCRCV血球凝集素／エステラーゼ(HE)遺伝子の497残基の塩基配列を決定した(図13及びSEQ ID No. 21)。これは165のアミノ酸に相当する(図14及びSEQ ID No. 22)。我々はCRCVが腸性性のイヌコロナウイルス(CCV)と驚くべき低い相同性を持ち、一方でウシコロナウイルス(LY138またはQuebec系統)及びヒトコロナウイルス(OC43系統)と予期せぬ高い相同性を持つことを突き止めた。

【0015】

CRCVスパイクcDNAの一部を挿入したpT7Blue2プラスミド(Novagen)を含むXL1-Blue大腸性菌(ストラタジーン)である“Spiked-1CRCV”の培養菌は、寄託番号NCIMB41146としてブダペスト条約に基づき2002年7月25日にNCIMB社に寄託されている。NCIMB41146の寄託者はザロイヤルヴェテリネリカレッジ(Royal College Street, London NW1 0TU, UK)である。NCIMB社の住所は23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, AB24 3RY, UK.である。

【0016】

CRCVpol遺伝子と他のウイルスの対応する部分との比較に基づいて、CRCVと11の公知のコロナウイルスとの系統発生上の関係を決定した(図5)。ウシコロナウイルス(BCV)、ヒトコロナウイルス(HCV)OC43系統及び血球凝集を起こさせる脳脊髄炎ウイルス(HEV)が最もCRCVと相関していたが、一方で腸性CCVはCRCVと遠く関係しているにすぎないことが分かった。

【0017】

図6及び7に示すように、配列が決定されたpolcDNAの250残基及び対応する83のアミノ酸について、CRCVは腸性CCV(1-71系統)pol遺伝子(Genbankアクセス番号AF124986)の同一の領域に対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ68、5%及び75.9%の同一性しかもたない。

【0018】

配列が決定されたCRCVのS遺伝子の4092ヌクレオチド残基及び対応する1363のアミノ酸について、CRCVは腸性CCV（1-71系統）S遺伝子の同一の領域に対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ45%及び21.2%の同一性しかもない（図8）。

【0019】

腸性CCVはII属のコロナウイルスではないため、HE遺伝子を持たない。従ってCRCVのこの遺伝子の腸性CCVに対する配列同一性を決定することは不可能である。

【0020】

以下の場合を除き、2のヌクレオチドまたは2のアミノ酸配列間の同一性%はFASTA version 3.4 (Pearson WR. (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA". Methods Enzymol.;183:63-98) を用いて決定した。FASTAの設定はGap open penaltyを-16及びGap extension penaltyを-4とした。

【0021】

CRCVと腸性CCVのスパイク配列の同一性%はGCG version 1.0 (Genetics Computer Group, (1991), Program Manual for the GCG Package, Version 7, April 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) を用いて決定した。使用したGCGのパラメータは以下の通りである。DNAについてGap creation penalty 50、及びgap extension penalty 3、並びにタンパク質についてGap creation penalty 8、及びGap extension penalty 2。

【0022】

配列解析はClustal Xにより行った (Thompson et al., 1997)。

【0023】

対照的に、polcDNAの250残基の配列について、CRCVはBCVのQuebec系統のpol遺伝子 (Genbankアクセス番号AF220295) と98.8%の配列同一性、BCVのLY138系統のpol遺伝子 (Genbankアクセス番号AF124985) と98.4%の同一性、及びHCV OC43のpol遺伝子 (Genbankアクセス番号AF124989) と98.4%の配列同一性を持っていた。

【0024】

CRCV polタンパクの83のアミノ酸配列とBCV、HCV及びHEV polタンパクとの間には、1のアミノ酸の違いしか無く、CRCVにおいて、BCVゲノム (アクセス番号SWALL: Q91A29) における4975番に対応する部位がD (Asp) ではなくE (Glu) であった。従って、CRCV polタンパクは、この領域においてBCV、HCV及びHEV polタンパクと99%相同する。

【0025】

ここではIUPAC-IUB生化学命名委員会の1字及び3字のアミノ酸コードを用いる。

【0026】

HE遺伝子の決定された497ヌクレオチド残基及び対応する165のアミノ酸において、CRCVはBCVのLY138系統 (Genbankアクセス番号AF058942) の同一の領域に対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ98.994%及び98.2%の配列同一性を持っていた。CRCVは、ヒト腸性コロナウイルス (HECV) のHE遺伝子 (Genbankアクセス番号L07747) と98.189% (ヌクレオチド) 及び98.2% (アミノ酸) ; HCV OC43のHE遺伝子 (Genbankアクセス番号M76373) と97.4% (ヌクレオチド) 及び95.2% (アミノ酸) ; 及びHEV (Genbank アクセス番号AF481863) と92.0% (ヌクレオチド) 及び93.9% (アミノ酸) の配列同一性をそれぞれ持っていた。

【0027】

図16及び表3に示すように、CRCVのHEタンパクの165のアミノ酸において、CRCVのHEタンパクとBCV、HECV、HCV及びHEVのSタンパクとの間の3のアミノ酸配列の違いは、BCV、HECV、HCV OC43及びHEV HE遺伝子の2

10

20

30

40

50

35、242及び253番に対応する部位において、それぞれにL (Leu) 対しF (Phe)、T (Thr) 対しN (Asn)、及びV (Val) 対しL (Leu) であった。従って235番のF、242番のN及び253番のLがCRCVのHEタンパク特異的なアミノ酸とすることができる。

【0028】

CRCVのS遺伝子の決定された4092ヌクレオチド残基及び対応する1363のアミノ酸において、CRCVはBCVのLY138系統 (Genbankアクセス番号AF058942) の同一の領域に対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ97.3%及び96%の配列同一性を持っていた。図9及び10に示すように、CRCVはOC43系統のHCV (Genbankアクセス番号Z32768) と96.9% (ヌクレオチド) 及び95.2% (アミノ酸)、及びHEV (Genbankアクセス番号AF481863 (cDNA) 及びAAM77000 (タンパク)) と83.8% (ヌクレオチド) 及び80.4% (アミノ酸) の配列同一性をそれぞれ持っていた。

10

【0029】

CRCVのSタンパクにおける1363のアミノ酸について、CRCVのSタンパクとBCV、HCV、及びHEV Sタンパクのそれぞれとの間で異なるアミノ酸を以下の表1に列挙する。従って、表1に列挙されるアミノ酸がCRCVのSタンパク特異的なアミノ酸であると言することができる。アミノ酸はCRCVタンパクの最初のM残基を始点として、図4に示されるような番号が付されている。

【表 1】

表 1: BCV、HCV及びHEVのSタンパクには存在しない、CRCVのSタンパクに特異的な39のアミノ酸のリスト

位置	アミノ酸
103	V
118	V
166	D
171	M
179	K
192	P
210	S
235	H
267	F
388	F
407	M
436	S
440	I
447	I
501	F
525	Y
528	N
540	L
582	K
608	G

位置	アミノ酸
692	G
695	S
757	W
758	G
763	Q
769	T
786	P
792	H
818	R
827	P
828	V
887	F
933	D
977	F
1011	T
1018	S
1063	K
1256	L
1257	M

10

20

30

40

【0030】

本発明の第1の側面は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、表4に示すアミノ酸配列のCRCVのSタンパクと少なくとも75%の配列同一性を有し、少なくとも103番のV、118番のV、166番のD、171番のM、179番のK、19

50

2 番の P、2 1 0 番の S、2 3 5 番の H、2 6 7 番の F、3 8 8 番の F、4 0 7 番の M、4 3 6 番の S、4 4 0 番の I、4 4 7 番の I、5 0 1 番の F、5 2 5 番の Y、5 2 8 番の N、5 4 0 番の L、5 8 2 番の K、6 0 8 番の G、6 9 2 番の G、6 9 5 番の S、7 5 7 番の W、7 5 8 番の G、7 6 3 番の Q、7 6 9 番の T、7 8 6 番の P、7 9 2 番の H、8 1 8 番の R、8 2 7 番の P、8 2 8 番の V、8 8 7 番の F、9 3 3 番の D、9 7 7 番の F、1 0 1 1 番の T、1 0 1 8 番の S、1 0 6 3 番の K、1 2 5 6 番の L、及び 1 2 5 7 番の M のうち少なくとも 1 を有するものである。アミノ酸は、表 4 (SEQ ID No. 4) に示されるように C R C V の S タンパクの最初の M を始点として番号が付されている。

【0031】

10

当然ながら、C R C V の S タンパクの部分ヌクレオチド配列は、D-1 C R C V 系統の大腸性菌に含まれるプラスミドの挿入配列をシーケンスすることにより、当業者であれば容易に決定することができる。この大腸性菌は、寄託番号 N C I M B 4 1 1 4 6 としてブダペスト条約に基づき 2 0 0 2 年 7 月 2 5 日に N C I M B 社に寄託されている。さらにこの DNA は、ハイブリダイゼーションプローブまたはプローブ設計の基礎として、イヌにおける C R C V 核酸の単離に用いることができる。

【0032】

念のためではあるが、本発明は、コロナウイルスの S タンパクまたはその断片であって、表 4 に示すアミノ酸配列の C R C V の S タンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも 7 5 % の配列同一性を有し、少なくとも表 1 に列挙する位置の C R C V の S タンパクに特異的なアミノ酸のうち少なくとも 1 を有するものである。

20

【0033】

“タンパク”には糖タンパクの意味も含まれる。糖タンパクのアミノ酸配列は、糖タンパクのポリペプチド主鎖の配列であり、そこに付属する糖の型、数、配列及び位置とは無関係である。

【0034】

典型的には、本発明は単離されたタンパクまたは組み換えタンパクを含み、C R C V 構成部分として存在する改変されていない C R C V タンパクを含まない。

【0035】

本発明はコロナウイルスの S タンパク及びその断片であって、C R C V の S タンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも 7 6 % のアミノ酸配列同一性を有し、または C R C V の S タンパクと少なくとも 7 7 %、少なくとも 7 8 %、少なくとも 7 9 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有し、表 1 に列挙する位置において少なくとも 1 の C R C V の S タンパクに特異的なアミノ酸を有するものを包含する。

30

【0036】

40

また、本発明は、コロナウイルスの S タンパク及びその断片であって、C R C V の S タンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有し、表 1 に列挙する位置に置いて少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、少なくとも 2 0、少なくとも 2 1、少なくとも 2 2、少なくとも 2 3、少なくとも 2 4、少なくとも 2 5、少なくとも 2 6、少なくとも 2 7、少なくとも 2 8、少なくとも 2 9、少なくとも 3 0、少なくとも 3 1、少なくとも 3 2、少なくとも 3 3、少なくとも 3 4、少なくとも 3 5、少なくとも 3 6、少な

50

くとも37、または少なくとも38のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するものを包含する。

【0037】

好ましくは、コロナウイルスSタンパクまたはその断片は、表1に列挙する位置においてCRCVのSタンパクに特異的な39のアミノ酸残基のすべてを有する。

【0038】

従って、本発明はBCV、HCVもしくはHEVのSタンパクまたはその断片であって、表1に列挙する位置の内すくなくとも1の位置においてCRCVのSタンパクに近づくよう改変されているものを包含する。

【0039】

好ましくは、本発明のコロナウイルスSタンパクは図4（SEQ ID No. 4）に示す配列または前記配列と少なくとも97%の同一性を持つその変体を有するまたはのみからなるCRCVのSタンパクである。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0040】

従って、本発明のコロナウイルスSタンパクの変体は図4（SEQ ID No. 4）に示す配列を有するまたはのみからなるが、図4に示す配列と1から40個のアミノ酸の違いがある。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と40未満のアミノ酸の違いを有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも35、少なくとも30、少なくとも25、少なくとも20、少なくとも15、または少なくとも10、9、8、7、6、5、4、3、もしくは2のアミノ酸の違いを有し、または1のアミノ酸の違いを有する。

【0041】

また、本発明は図4（SEQ ID No. 4）に示す配列の断片であり、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するCRCVのSタンパクの断片を包含する。

【0042】

本発明は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのSタンパク（SEQ ID No. 14、Genbankアクセス番号AF058942）と少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有し、少なくとも103番のV、118番のV、166番のD、171番のM、179番のK、192番のP、210番のS、235番のH、267番のF、388番のF、407番のM、436番のS、440番のI、447番のI、501番のF、525番のY、528番のN、540番のL、582番のK、608番のG、692番のG、695番のS、757番のW、758番のG、763番のQ、769番のT、786番のP、792番のH、818番のR、827番のP、828番のV、887番のF、933番のD、977番のF、1011番のT、1018番のS、1063番のK、1256番のL、及び1257番のMのうち少なくとも1を有するものを包含する。

【0043】

念のためではあるが、本発明はLY138系統のBCVのSタンパク（SEQ ID No. 14）と少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有し、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するコロナウイルスのSタンパクまたはその断片を包含する。

【0044】

本発明は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのSタンパクと少なくとも76%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも77%、少な

10

20

30

40

50

くとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有し、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するものを包含する。

【0045】

本発明は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのSタンパク(SEQ ID No. 14)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有し、表1に示す位置において少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、または少なくとも38のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するものを包含する。

【0046】

好ましくは、前記コロナウイルスのSタンパクまたはその断片は表1に示す位置における39のすべてのCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸残基を有する。

【0047】

本発明の第2の側面は、コロナウイルスのpolタンパクまたはその断片であって、BCVのpolタンパク(SEQ ID No. 5)と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有し、BCVゲノム(アクセス番号SWALL: Q91A29)の4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有するものである。

【0048】

本発明は、コロナウイルスpolタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのpolタンパクと少なくとも91%のアミノ酸配列同一性、またはLY138系統のBCVのpolタンパクと少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有し、BCVゲノム(アクセス番号SWALL: Q91A29)の4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有するものを包含する。

【0049】

好ましくは、前記コロナウイルスのpolタンパクまたはその断片は、図2に示すアミノ酸配列を有するまたはのみからなるCRCV polタンパクまたはその断片である。

【0050】

従って、本発明はBCV、HCVまたはHEVのpolタンパクまたはその断片であって、BCVゲノムの9475番に相当するアミノ酸がCRCVのpolタンパクに近づくよう改変されているものを包含する。

【0051】

また、本発明は図2(SEQ ID No. 2)に示す配列の断片を有するCRCVのpolタンパクの断片であり、BCVゲノムの4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有するものを包含する。

【0052】

本発明の第3の側面は、コロナウイルスのHEタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのpolタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLの

少なくとも1を有するものである。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM（1番となる）を始点として番号が付されている。

【0053】

本発明は、コロナウイルスのHEタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも91%のアミノ酸配列同一性、またはLY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLの少なくとも1を有する。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM（1番となる）を始点として番号が付されている。

10

【0054】

本発明は、LY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性、またはLY138系統のBCVのpolタンパクと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLのうちの2を有する。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM（1番となる）を始点として番号が付されている。

【0055】

本発明は、LY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも91%のアミノ酸配列同一性、またはLY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLのうちの3個すべてを有する。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM（1番となる）を始点として番号が付されている。

20

【0056】

好ましくは、前記コロナウイルスのHEタンパクまたはその断片は、図14（SEQ ID No. 22）に示すアミノ酸配列を有するまたはのみからなるCRCVのHEタンパクまたはその断片である。

【0057】

従って、本発明はBCV、HCVもしくはHEVのHEタンパクまたはその断片であり、235番、242番または253番に相当するアミノ酸の1以上がCRCVのHEタンパクに近づくよう改変されているものを包含する。

30

【0058】

また、本発明は図14（SEQ ID No. 22）に示す配列の断片を有するCRCVのHEタンパクの断片であり、235番のL、242番のNまたは253番のLの1以上を有する。これらのアミノ酸の番号は、LY138系統のBCVのHEタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）と対応し、残基の番号1はLY138系統のBCVのHEタンパクの最初のMを始点とする。

【0059】

ここでは、上記本発明の第1、第2及び第3の側面のコロナウイルスのS、pol及びHEタンパクを“CRCV”または“CRCV様”タンパクとする。

40

【0060】

“CRCVのSタンパク”とは、図4（SEQ ID No. 4）に示す天然のCRCVのSのアミノ酸配列、または表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するその断片の配列を有する、Sタンパクまたはその断片である。

【0061】

“CRCVのpolタンパク”とは、図2（SEQ ID No. 2）に示す天然のCRCVのpolのアミノ酸配列またはBCVゲノムの4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有するその断片の配列を有する、polタンパクまたはその断片である。

50

【0062】

“CRCVのHEタンパク”とは、図14（SEQ ID No. 22）に示す天然のCRCVのHEタンパクのアミノ酸配列または235番のF、242番のN及び253番のLの少なくとも1を有するその断片の配列を有する、HEタンパクまたはその断片である。これらのアミノ酸番号はLY138系統のBCVのHEタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）と対応しており、LY138系統のBCVのHEタンパクの最初のMを1番の残基としている。

【0063】

“CRCV様Sタンパク”とは、天然のCRCVのSアミノ酸配列（図4及びSEQ ID No. 4）と同一のアミノ酸配列ではないが、CRCVまたはLY138系統のBCVのSタンパクに対応する領域と少なくとも75%の配列同一性を持ち、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するSタンパクまたはその断片である。

10

【0064】

また、“CRCV様Sタンパク”には、天然のCRCVのSアミノ酸配列（図4及びSEQ ID No. 4）と同一のアミノ酸配列ではないが、表4に示す配列と少なくとも97%の同一性を有する表4に示す配列の変体を有するあるいはのみからなるSタンパクも含まれる。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸配列同一性を有する。

20

【0065】

“CRCV様polタンパク”とは、天然のCRCVのpolアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列ではないが、CRCVまたはLY138系統のBCVのpolタンパクの対応する領域と少なくとも90%の配列同一性を持ち、BCVゲノムの4975番に対応する位置にEを有するpolタンパクまたはその断片である。

【0066】

“CRCV様HEタンパク”とは、天然のCRCVのHEアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列ではないが、LY138系統のBCVのHEタンパクの対応する領域と少なくとも90%の配列同一性を持ち、235番のF、242番のN及び253番のLのうちの1以上を有するHEタンパクまたはその断片である。これらの3のアミノ酸の番号はLY138系統のBCVのHEタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）において、LY138系統のBCVのHEタンパクの最初のMを1番の残基とするアミノ酸番号に対応する。

30

【0067】

好ましくは、CRCVもしくはCRCV様タンパク、またはその断片は、少なくともアミノ酸10個の長さである。より好ましくは、CRCVもしくはCRCV様タンパク、またはその断片は、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、少なくとも1000、少なくとも1100、または少なくとも1200個のアミノ酸の長さである。

40

【0068】

好ましくは、CRCVもしくはCRCV様タンパク、またはその断片は、アミノ酸1300個未満の長さである。より好ましくは、CRCVもしくはCRCV様タンパク、またはその断片は、約1200未満、約1100未満、約1000未満、約900未満、約800未満、約700未満、約600未満、約500未満、約400未満、約300未満、約200未満、約100未満または約50未満のアミノ酸の長さである。

【0069】

CRCVタンパクはCRCVから単離されてもよく、または例えば単離したタンパクの

50

部分分解などのタンパク化学的な方法を用いて作製されてもよく（末端分解でも内分解でも良い）、または新たに合成されるものでもよい。あるいは、C R C V様タンパクだけでなくC R C Vタンパクは、組み換えDNA技術により作製されてもよい。核酸のクローニング、取り扱い、修飾及び発現、並びに発現したタンパクの精製に好適は公知であり、例えば参照により組み込まれるSambrook et al (2001) "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", 3rd edition, Sambrook et al (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USAに記載されている。

【0070】

C R C VまたはC R C V様タンパクのより短い断片、即ちペプチドは、一般的な方法によって合成して良い。ペプチドはLu et al (1981) J. Org. Chem. 46, 3433及びそこでの参照において記載される固相ペプチド合成のFmocポリアミド法により合成して良い。N-アミノ類は、9-フルオロレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 類により一時的に保護される。この塩不安定な保護基は20%ピペリジンのN、N-ジメチルホルムアミド溶液の作用により反復的に開裂する。側鎖の官能性は、そのブチルエーテル（セリン、トレオニン及びチロシンの場合）、ブチルエステル（グルタミン酸及びアスパラギン酸の場合）、ブチロキシカルボニル誘導体（リシン及びヒスチジンの場合）、トリチル誘導体（システインの場合）、及び4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホン誘導体（アルギニンの場合）として保護してもよい。ここで、グルタミンまたはアスパラギンがC末端基である場合、4, 4'-ジメトキシベンズヒドリル基が側鎖アミノ官能性を保護するのに用いられる。固相支持体は、ジメチルアクリルアミド（主鎖モノマー）、ビスアクロイルエチレンジアミン（架橋剤）及びアクリロイルサルコジンメチルエステル（機能化剤）の3種のモノマーから構成されるポリジメチルアクリルアミドポリマーを素材とする。ペプチド-樹脂間の開裂可能な結合剤としては、酸に不安定な4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸誘導体を用いられる。すべてのアミノ酸誘導体は、あらかじめ作られた対称形の無水物誘導体として添加される。但し、アスパラギン及びグルタミンは逆N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド/1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを介したカップリング法を用いて添加される。すべてのカップリング及び保護解除反応はニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸もしくはisotinテスト法により測定される。合成が完了すると、50%スカベンジャー混合物を含む95%トリフルオロ酢酸で処理してペプチドを樹脂支持体より開裂させ、同時に側鎖保護基を取り除く。スカベンジャーは一般にはエタンジオール、フェノール、アニソール及び水が使われるが、合成されたペプチドを構成するアミノ酸に従って正確に選択される。減圧蒸発によりトリフルオロ酢酸を除去したのち、ジエチルエーテルと共に粉碎して粗ペプチドを得る。使用したあらゆるスカベンジャーは水相の凍結乾燥による簡便な抽出処理により取り除かれ、粗ペプチドはスカベンジャーフリーとなる。ペプチド合成のための試薬は、カルビオケム-ノババイオケム社（イギリス）、ノッティンガム NG7 2QJ、イギリスにより市販されている。精製は限外クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー及び（主に）逆相高性能液体クロマトグラフィーなどの単独使用もしくは組み合わせにより行われる。ペプチドの分析は薄層クロマトグラフィー、逆相高性能液体クロマトグラフィー、酸加水分解によるアミノ酸分析、及び高速原子衝突 (FAB) 質量分析法により行ってよい。

【0071】

本発明の第4の側面はポリヌクレオチドであって、本発明の第1、第2及び第3の側面によるC R C VまたはC R C V様のS、p o lまたはH Eタンパクをコードするポリヌクレオチドまたはその相補ポリヌクレオチドである。

【0072】

好ましくは、前記ポリヌクレオチドは本発明の第1の側面のC R C VのSタンパクをコードするポリヌクレオチドまたはその相補ポリヌクレオチドである。

【0073】

より好ましくは、C R C VのSタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図3 (SEQ ID No. 3) に記載の配列を有するあるいはのみからなる。

【0074】

当然ながら、図3 (SEQ ID No. 3) に示す配列は3531番にYを含み、これはCもしくはTを表す。どちらの場合も、対応するアミノ酸はIleである。従って、本発明は図3に示す配列を有するあるいはのみからなるCRCVのSタンパクをコードするポリヌクレオチドであり、3531番にCを有するものを包含する。また、本発明は図3に示す配列を有するあるいはのみからなるCRCVのSタンパクをコードするポリヌクレオチドであり、3531番にTを有するものも包含する。

【0075】

また本発明は、図3 (SEQ ID No. 3) に示す配列の断片を有し、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するタンパクをコードするCRCVのSのポリヌクレオチドも包含する。

10

【0076】

好ましくは、polタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図1 (SEQ ID No. 1) に示す配列またはその相補的配列を有するもしくはのみからなる。

【0077】

また、本発明はBCVゲノムの4975番に相当する位置にEを有するタンパクをコードする図1 (SEQ ID No. 1) に示す配列の断片を有するCRCVポリヌクレオチドまたはその相補ヌクレオチドを包含する。

【0078】

好ましくは、HEタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図13 (SEQ ID No. 21) に示す配列またはその相補配列を有するまたはのみからなる。

20

【0079】

また、本発明は235番のF、242番のNまたは253番のLの1以上を有するタンパクをコードする図13 (SEQ ID No. 21) に示す配列の断片を有するCRCVのHEのポリヌクレオチドを包含する。これらの3のアミノ酸の番号はLY138系統のBCVのHEタンパク (Genbankアクセス番号AF058942) において、LY138系統のBCVのHEタンパクの最初のMを1番の残基とするアミノ酸番号に対応する。

【0080】

上記のポリヌクレオチドをここでは本発明のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドとする。

30

【0081】

“CRCV様ポリヌクレオチド”とは、図1、3及び13 (SEQ ID No. 1、3及び21) に列挙するような天然のCRCV cDNA配列のすべてまたはその断片を有さないが、上記のCRCVもしくはCRCV様のSpolまたはHEタンパクをコードするヌクレオチド、またはその相補的なヌクレオチドである。

【0082】

CRCVはプラス鎖RNAウイルスである。本発明のポリヌクレオチドはDNAまたはRNAであってよい。RNAはプラス鎖またはマイナス鎖RNAであってよい。DNAは一本鎖または二本鎖DNAであってよい。

【0083】

CRCVなどのプラス鎖RNAウイルスからcDNAをクローニングし配列を決定するための好適な方法は公知であり、例えば本願に参照により取り込まれるSambrook et al 2001に記載されている。

40

【0084】

本発明のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドはどのような大きさであってもよい。しかしながら、プローブ用または増幅用など特定の目的に対しては、核酸は3000塩基対 (核酸が2本鎖の場合) または塩基 (核酸が一本鎖の場合) より少ないことが好ましく、より好ましくは1000より少ない、さらには10から100、さらに好ましくは15から30である。以下により詳細に記載するが、1本鎖DNAオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用またはポリメラーゼ連鎖反応におけるプ

50

ライマーとしての使用に好適であり、特に好ましい。

【0085】

オリゴヌクレオチドとしては、CRCVのS、p o lまたはHEポリヌクレオチドを特異的に増幅またはこれらと特異的にハイブリダイズするが、BCV、HCVまたは腸性CCVのS、p o lまたはHEポリヌクレオチドとは作用しないものが特に好ましい。当業者であれば、図6、8、9、及び15のヌクレオチド配列の比較を参照することで好適なオリゴヌクレオチドを決定することができる。

【0086】

当然ながら、CRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドは、たとえ非常にストリンジентな状況下であっても、CRCVに加えてHCV、BCV及びHEV由来のRNAまたはDNAのいずれの核酸ともハイブリダイズしてもよい。しかしながら、CRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドはCRCV由来の核酸とであれば、HCV、BCVまたはHEV由来の核酸よりもよりストリンジентな状況下でもハイブリダイズすることが好ましい。これは実験的に、あるいはオリゴヌクレオチド配列とCRCV、HCV、BCVまたはHEV配列のそれぞれとの比較により決定することができるが、これらは当業者によりよく知られている (Sambrook et al 2001)。

【0087】

また、当然ながらCRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドはCRCVに加えて腸性CCV由来のRNAまたはDNAのいずれの核酸ともハイブリダイズしてもよい。しかしながら、CRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドはCRCV由来の核酸とであれば、CCV由来の核酸よりもよりストリンジентな状況下でもハイブリダイズすることが好ましい。これは実験的に、あるいはオリゴヌクレオチドの配列とそれぞれの配列との比較により決定することができるが、これらは当業者によりよく知られている (Sambrook et al 2001)。好ましくは、オリゴヌクレオチドはどのようなストリンジентな状況下でも腸性CCV由来の核酸とはハイブリダイズしないことが好ましい (下記参照)。

【0088】

簡便のためとして、CRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドはさらに検出可能な標識を有する。

【0089】

“検出可能な標識”には、公知の方法により核酸分子に容易に取り込ませることができる ^{32}P 、 ^{33}P または ^{35}S などのあらゆる簡便な放射性標識が含まれる。また、核酸分子に容易に取り込ませることができるあらゆる簡便な蛍光または化学ルミネッセンス標識も含まれる。さらに、“検出可能な標識”には、他の部分の結合することで検出できる一部分 (ストレプトアビジンと結合することで検出できるビオチンなど) や、酵素などの一部分で無色の化合物を色の付いた化合物に転化する能力、またはその逆の能力を持つことから検出できるもの (例えばアルカリホスファターゼは、無色の α -リン酸ニトロフェニルを色の付いた α -ニトロフェノールに転化することができる) も含まれる。簡便のためとして、核酸プローブは固定されたアレイの特定の位置を占めるものであってよく、核酸がプローブにハイブリダイズしたかどうかをアレイにおけるハイブリダイゼーションの位置を参照することによって決定することができる。

【0090】

[^{32}P] dCTPによる標識は、アマシャムのRediprime random primer labelling kitを用いて行ってよい。

【0091】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Saiki et al (1988) Science 239, 487-491) に好適に用いられるプライマーが好ましい。好適なPCRプライマーとしては以下の特性を持つものであってよい。

【0092】

オリゴヌクレオチドの5'末端の配列が増幅される標的の配列と適合する必要が無いことはよく知られている。

10

20

30

40

50

【0093】

通常PCRプライマーは特に3'末端において互いに2塩基以上の相互に相補的な構造を持たない。そうした場合、“プライマーダイマー”と呼ばれる副産物の形成が促進されるためである。2のプライマーの3'末端がハイブリダイズした場合、それらは“primed template”複合体を形成し、プライマーの伸長により“プライマーダイマー”と呼ばれる短い複製産物となる。

【0094】

プライマーにおいては分子内二次構造を避けるべきである。対称PCRとしては、40-60%のG+C含量で、1種の塩基が長く連続していないものが双方のプライマーに推奨される。DNAプローブハイブリダイゼーションの研究と古典的な解離温度の算出を組み合わせると、所定のプライマーは特定の温度でアニールすべきであり72℃の伸長温度ではプライマー/テンプレートハイブリッドが解離してしまう、といったことがしばしば予想される。実際、ハイブリッドはPCRにおいて単純な T_m 計算により一般的に予想されるものよりも有効である。

【0095】

最適なアニール温度は経験的に決定してよく、予想よりも高くても良い。 Taq DNAポリメラーゼは37~55℃の領域では活性を持っているので、プライマーの伸長はアニールステップの間に起こり、ハイブリッドは安定化される。プライマーの濃度は従来の(対称)PCRと同じであり、典型的には0.1~1 μ Mの範囲である。

【0096】

偏在的に発現している遺伝子に相補的なプライマーなど用いてコントロールの増幅反応を行えばより好ましい。コントロールの産物とCRCVまたはCRCV様産物が異なるサイズとなり、例えばこれら2の産物は例えばアガロースゲル電気泳動での移動度など、検出手段により区別することができるなどの有益性がある。しかしながら、2の産物は例えば共に100から1000塩基長または100から600塩基長など、同様なサイズであることが望ましいかもしれない。これにより例えばゲル電気泳動による産物の同時分析に役立つかもしれない。また、例えば反応中の異なる段階における産物の相対的な生成速度といった点から見て、コントロールとCRCVまたはCRCV様の増幅反応が同様な性能特性を持つことを意味するかもしれない。

【0097】

ポリメラーゼ連鎖反応、QBレプリカーゼ及びリガーゼ連鎖反応を含む本発明の方法では、あらゆる核酸増幅プロトコルを用いることができる。また、3SRとも呼ばれるNASBA (nucleic acid sequence based amplification:核酸配列を基礎とする増幅法)はCompton (1991) Nature 350, 91-92 及び AIDS (1993), Vol 7 (Suppl 2)に記載されるようにして、S108またはSDA (strand displacement amplification)はWalker et al (1992) Nucl. Acids Res. 20, 1691-1696に記載されるようにして用いることができる。ポリメラーゼ連鎖反応は、その平易さから特に好ましい。

【0098】

本発明の好適な核酸の組がPCRに用いられる場合、その産物はゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色によって検出するのが簡便である。その他、プローブとして増幅したDNAとハイブリダイズできる標識したオリゴヌクレオチドを用いることも便利である。PCRにより増幅を行った場合、オリゴヌクレオチドプローブは2のプライマーにより定まるインタープライマー配列とハイブリダイズする。オリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは10から50塩基長であり、より好ましくは15から30塩基長である。オリゴヌクレオチドプローブは増幅されたDNAより長くてもよく、1のまたは両方のプライマーを含んでいてもよい。しかしこの場合、ハイブリダイズの条件として、プローブはプライマー単体とはハイブリダイズせず、プローブとハイブリダイズできるインタープライマー配列を含む増幅産物のみとハイブリダイズすべきである。

【0099】

プローブは例えば ^32P 、 ^33P 及び ^35S などの放射活性ヌクレオチドにより標識し

10

20

30

40

50

てもよく、または蛍光色素により標識しても良い。オリゴヌクレオチドプローブを蛍光で標識した場合、増幅されたDNA産物は溶液中で検出される（例えばBalaguer et al (1991) "Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescence adsorbent" Anal. Biochem. 195, 105-110及びDilesare et al (1993) "A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation" BioTechniques 15, 152-157参照）。

【0100】

また、PCR産物は、蛍光体－消光剤の組み合わせを有するプローブを用いる、プローブを固体の支持体に固着させる、ビオチンタグを有するプローブを用いる、または捕獲プローブ及び検出プローブの組み合わせを用いて検出することによっても検出することができる。

10

【0101】

蛍光体－消光剤の組み合わせはPCR反応の量的な測定（例えばRT-PCR）に特に好適である。好適なプローブを用いた蛍光偏光もまた、PCR産物の検出に用いても良い。

【0102】

また、本発明は、第4の側面のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドを有するベクターを包含する。

【0103】

原核生物ベクターのプラスミドとしては、Biorad研究所（リッチモンド、CA、アメリカ）より市販されるpUC18、pUC19、pBR322及びpBR329；ファルマシア（ピスカタウェイ、NJ、アメリカ）より市販されるpTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540及びpRIT5；ストラタジーンクローニングシステム（ラホーラ、CA 92307、アメリカ）より市販されるpBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16A、pNH18A及びpNH46Aが典型的である。

20

【0104】

哺乳類細胞ベクターのプラスミドとしては、ファルマシア（ピスカタウェイ、NJ、アメリカ）より市販されるpSVLが典型的である。このベクターはクローニングされた遺伝子の発現にSV40後期プロモーターを用い、COS-1細胞のようなT抗原産生細胞において最も強い発現が見られる。誘導哺乳類発現ベクターの例としては、同様にファルマシア（ピスカタウェイ、NJ、アメリカ）より市販されるpMSGがある。このベクターは、マウス乳がんウイルスの長い末端反復の糖質コルチコイド誘導性のプロモーターをクローニングされる遺伝子の発現に用いる。

30

【0105】

酵母プラスミドのベクターとしては、一般にストラタジーンクローニングシステム（ラホーラ、CA 92307、アメリカ）より市販されるpRS403-406及びpRS413-416が有用である。pRS403、pRS404、pRS405及びpRS406プラスミドは酵母Integratingプラスミド（YIps）であり、酵母に選択可能なマーカーであるHIS3、TRP1、LEU2及びURA3を取り込ませる。pRS413-416プラスミドは酵母動原体プラスミド（YCps）である。

【0106】

一般的に、本発明のCRCV及びCRCV様ポリヌクレオチドは、プラスミドなどの発現ベクターに適当な向きと正しい読み枠で挿入される。所望のホストに認識される適切な転写及び翻訳調節を行う制御ヌクレオチド配列をベクターへの挿入に先立って結合させても良い。ただし、このような制御は一般的には発現ベクターにおいて行うことができる。従って本発明のポリヌクレオチドの挿入は、適切なプロモーターに効果的に結合するものであって良い。真核生物のプロモーターとしては、CMVimmediate earlyプロモーター、HCVチミジンキナーゼプロモーター、初期及び後期SV40プロモーター及びレトロウイルスのLTRsのプロモーターが挙げられる。当業者であれば、他の好適なプロモーターも知りうるであろう。発現の構築としては、望ましくは転写初期化及び終止のためのサイトも含み、転写される領域には、翻訳のためのリボゾーム結合サイトを含む（Hastin

40

50

gs et al, International Patent No. WO 98/16643)。

【0107】

コード配列、及び例えば適切な転写及び翻訳制御部を含む発現ベクターの構築には当業者に公知の方法を用いることができる。そのような方法のひとつが、ホモポリマー末端を介した連結である。ポリdA（またはポリdC）ホモポリマー末端はDNA断片の露出した3'-OH基に付加され、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによりクローニングされる。次にその断片は、線状プラスミドベクターの末端に結合されたポリdT（またはポリdG）末端とアニールすることができる。アニールで残された隙間はDNAポリメラーゼ及びDNAリガーゼにより結合される自由末端により埋めることができる。

【0108】

他の方法としては、付着端を介した結合が挙げられる。適合する付着端は、好適な制限酵素の作用によりDNA断片及びベクター上で作製することができる。こうした末端は相補的な塩基の対合において即座にアニールし、残ったニックはDNAリガーゼの作用により閉じられる。

【0109】

その他の方法では、リンカーまたはアダプターと呼ばれる合成分子を用いる。平滑末端を持つDNA断片は、3'突出末端を除去し、陥凹末端3'末端を挿入するバクテリオファージT4DNAポリメラーゼまたは大腸性菌DNAポリメラーゼIにより作製することができる。認識配列を含む平滑末端の2本鎖DNAの断片である合成リンカーはT4DNAリガーゼにより平滑末端のDNA断片と結合することができる。続いてそれらは適切な制限酵素により切断されて付着端を形成し、適切な末端の発現ベクターと結合する。アダプターもまた結合に用いる1の平滑末端を含む化学的に合成されたDNAであるが、あらかじめ形成された付着端も持つ。

【0110】

各種の制限エンドヌクレアーゼサイトを含む合成リンカーが、International Biotechnologies社、New Haven、CN、USAなど様々な企業等から市販されている。

【0111】

本発明のポリヌクレオチドを修飾するのに望ましい方法のひとつが、Saiki et al (1988) Science 239, 487-491に開示されるポリメラーゼ連鎖反応を用いる方法である。この方法では、酵素反応で増幅されるDNAは、2の特定のオリゴヌクレオチドプライマーと隣接し、このプライマー自身は増幅されたDNAに取り込まれる。この特定のプライマーは、制限エンドヌクレアーゼ認識サイトを含んでも良く、公知の方法で発現ベクターにクローニングするのに用いられる。

【0112】

また、本発明はCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドを有するベクターにより形質転換された宿主細胞を包含する。宿主細胞は真核生物と原核生物のいずれであってもよい。ベクター中のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドが糖タンパクとして発現する場合、前記宿主細胞は真核生物の宿主細胞であり、好ましくは哺乳類の宿主細胞である。

【0113】

原核生物の宿主細胞としては微生物細胞が好ましく、典型的には大腸性菌の系統である。例としては、Bethesda Research Laboratories社、Bethesda、MD、USAより市販されるDH5系統、American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville、MD、USA(No ATCC 31343)より市販されるRR1などである。好ましい真核生物の宿主細胞としては、酵母及び哺乳類の細胞が挙げられ、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒト線維芽細胞系などの脊椎動物の細胞が挙げられる。酵母の宿主細胞としては、ストラタジーンクローニングシステム（ラホーラ、CA92307、アメリカ）より市販されるYPH499、YPH500及びYPH501が挙げられる。好ましい哺乳類の宿主細胞としては、ATCCよりCCL61として市販されるチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ATCCよりCRL 1658として市販されるNIHスィスマウス胚細胞のNIH/3T3、及びATCCよりCRL1650として市販されるサル腎臓由

10

20

30

40

50

来C O S-1細胞が挙げられる。好ましい昆虫細胞としては、バキュロウイルス発現ベクターによりトランスフェクションすることができるS f 9細胞である。

【0114】

ベクターによる適切な宿主細胞の形質転換は、公知の方法により行うことができるが、典型的には用いるベクターの種類に依存する。原核生物の宿主細胞の形質転換に関しては、例えばCohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 and Sambrook et al (2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい。酵母細胞の形質転換については、Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NYに記載されている。Beggs (1978) Nature 275, 104-109の方法もまた、有用である。脊椎動物の細胞については、その導入に有用な試薬、例えばリン酸カルシウム及びD E A Eデキストランまたはリボソーム製剤などが、ストラタジーンクローニングシステムまたはLife Technologies社 (Gaithersburg, MD 20877, USA) より市販されている。

10

【0115】

エレクトロポレーションもまた細胞の形質転換に有用であり、酵母細胞、微生物細胞及び脊椎動物細胞の形質転換において公知である。

【0116】

例えば、参照により組み込まれるLuchansky et al (1988) Mol. Microbiol. 2, 637-646に記載される方法により種々の微生物を形質転換してもよい。2. 5 × P E B溶液に懸濁させたD N A-細胞混合物に2 5 μ F Dで6 2 5 0 V / c mのエレクトロポレーションを行うと、最大数の形質転換体が常に回収される。

20

【0117】

エレクトロポレーションによる酵母の形質転換の方法はBecker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182に記載される。

【0118】

D N Aを動物または植物の細胞に導入するには物理的な方法を用いてもよい。D N Aでコーティングした金またはタングステンの粒子を細胞に打ち込む方法がある。

【0119】

首尾良く形質転換された細胞、即ちC R C VまたはC R C V様D N A構築物を含んだ細胞、は公知の方法により識別される。例えば、選別方法のひとつとしては、発現ベクターに形質転換細胞において選別可能な特徴をコードするD N A配列（マーカー）を組み込む方法がある。

30

これらのマーカーとしては、ジヒドロ葉酸還元酵素のG 4 1 8、または真核生物の細胞培養においてはネオマイシン耐性、大腸性菌及びその他の微生物の培養においてはテトラサイクリン、カネマイシン及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。その他にも、選別可能な特徴を与える遺伝子を他のベクターに入れて、目的とする宿主細胞を協同的に形質転換するのに用いることもできる。

【0120】

マーカー遺伝子は形質転換体を特定するのに用いられるが、どの細胞が組み換えD N A分子を含み、自己結合ベクター分子を含むのかを決定できるものが望ましい。これは、D N A断片の挿入により分子上に存在する遺伝子のひとつが完全性を失うようなクローニングベクターを用いることによって得られる。従って、形質転換体はそうした遺伝子の機能の欠損に基づいて特定することができる。

40

【0121】

他にも、首尾良く形質転換された細胞を特定する方法として、本発明の発現構築物を導入した結果としてC R C VまたはC R C V様のS、p o lまたはH Eタンパクを産生している細胞を培養する方法がある。細胞を回収して溶解し、D N A成分を分析して目的のD N Aの存在をSouthern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503 or Berent et al (1985) Biotech. 3, 208などに記載される方法で確認することができる。他にも、後述するような抗体を用いて上清における目的のタンパクの存在を検出することもできる。

50

【0122】

組み換えDNAの存在を直接的にアッセイする方法に加えて、組み換えDNAが直接タンパクを発現するのであれば、形質転換が成功したかどうかは公知の免疫的な方法によって確認することができる。例えば、発現ベクターによる形質転換が成功した細胞は適当な抗原性を示すタンパクを産生する。形質転換が疑われる細胞の試料を回収して、適切な抗体を用いてタンパクをアッセイを行う。

【0123】

従って、形質転換された宿主細胞自体に加えて、本発明にはそれらの細胞の培養物も意図されている。好ましくは、栄養培地中のモノクローナルな（系統的に単一の）培養物またはモノクローナルな培養物から派生する培養物である。

10

【0124】

典型的には上記のベクターに挿入された組み換えCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドにより形質転換された宿主細胞は、続いてここに開示される技術を参考に公知の技術により適当な条件で十分な時間培養され、CRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドによりコードされるCRCVまたはCRCV様タンパクが発現させて回収する。

【0125】

CRCVまたはCRCV様タンパクは組み換え細胞培養物より公知の方法により回収及び生成される。公知の方法としては、硫酸またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、水酸アパタイトクロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーが挙げられる。最も好ましいのは、高性能液体クロマトグラフィー“HPLC”を用いた精製である。

20

【0126】

例えば、バキュロウイルス系の発現において、CRCVスパイク遺伝子をコードする組み換えDNAはpMelBac (Invitrogen)などの好適な移転ベクターにクローニングしても良い。バキュロウイルスDNA（例えばBac-N-Blue/Invitrogen）と共に導入することで、スパイクタンパクをコードする組み換えバキュロウイルスとなる。好適な昆虫細胞系（例えばSf9、Sf21、High Five/Invitrogen）に適切な感染効率で感染させると、組み換えスパイクタンパクが発現する。タンパクの発現は、適当な試薬（例えば回復期のイヌ血清またはその他のウイルス特異的な抗体）を用いてウェスタンブロットティングまたはELISAにより確認することができる。

30

【0127】

従って本発明は、本発明のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドによりコードされるCRCVまたはCRCV様タンパクを得る方法を包含する。前記方法は、典型的にはベクターであるCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドを有する宿主細胞の培養することと、タンパク質を前記宿主細胞内で発現させることと、前記タンパク質を精製することを有する。本発明はさらに、この方法により得られるタンパク質を包含する。

【0128】

従って本発明は、典型的にはSタンパクであり、本発明のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドによりコードされるグリコシル化CRCVまたはCRCV様タンパクも包含する。前記方法は、典型的にはベクターであるCRCVまたはCRCV用のポリヌクレオチドを有する真核生物、より好ましくは哺乳類の宿主細胞の培養と、宿主細胞中のタンパクの発現と、前記グリコシル化タンパクの精製を有する。本発明はさらに、この方法によって得られるグリコシル化タンパクを包含する。

40

【0129】

第5の側面としての本発明は、抗CRCV抗体の作製方法であり、前記方法は動物において上記本発明の第1の側面のCRCVまたはCRCV様Sタンパクに対する免疫反応を起こさせることと、前記動物または前記動物由来の不死細胞から抗体を調製することを含む。前記方法は、その他に本発明の第1の側面に記載のCRCVまたはCRCV様Sタンパクを用いて抗体発現ライブラリから抗体を選択することを有していても良い。

50

【0130】

モノクローナル抗体を作製する方法及び技術は当業者に公知であり、例えば参照として組み込まれるMonoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) and in "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)に開示される方法がある。

【0131】

また本発明は、さらに任意でこのようにして得られた抗体のCRCVのSタンパクに対するアフィニティーがBCVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、及び好ましくは前記抗体のCRCVのSタンパクに対するアフィニティーがHCV及びHEVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、を有する。抗体の抗原に対する相対的なアフィニティーを決定する方法は公知である。

10

【0132】

また本発明は、本発明の第5の側面の方法により得られる、CRCVのSタンパクに対するアフィニティーがBCVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高い抗CRCV抗体を包含する。好ましくは、前記抗体のCRCVのSタンパクに対するアフィニティーは、さらにHCV及びHEVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高い。

【0133】

また本発明は抗CRCV抗体の作製方法を包含し、前記方法は動物において上記本発明の第3の側面のCRCVまたはCRCV様のHEタンパクに対する免疫応答反応を起こさせることと、前記動物または前記動物由来の不死細胞から抗体を調製することを含む。前記方法は、その他に本発明の第3の側面に記載のCRCVまたはCRCV様HEタンパクを用いて抗体発現ライブラリから抗体を選択することを有していても良い。

20

【0134】

また本発明は、さらに任意でこのようにして得られた抗体のCRCVのHEタンパクに対するアフィニティーがBCVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、及び好ましくは前記抗体のCRCVのHEタンパクに対するアフィニティーがHCV及びHEVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、を有する。抗体の抗原に対する相対的なアフィニティーを決定する方法は公知である。

30

【0135】

また本発明は、本発明の第5の側面の方法により得られる、CRCVのHEタンパクに対するアフィニティーがBCVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高い抗CRCV抗体を包含する。好ましくは、前記抗体のCRCVのHEタンパクに対するアフィニティーは、さらにHCV及びHEVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高い。

【0136】

好ましくは前記抗体はモノクローナル抗体である。しかしながら、本発明は単一特異的な抗CRCV抗体を包含する。前記抗体は、後述する抗体断片であって良い。

【0137】

前記モノクローナルまたは単一特異性の抗体は、Neuberger et al (1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799)において論じられるようなキメラ抗体であってよい。前記モノクローナル抗体または単一特異的な抗体は“イヌ化された”抗体であってよく、例えばマウス抗体のCDR領域をイヌ抗体の骨格に挿入して作られる。

40

【0138】

また本発明は、抗CRCV抗体の断片を包含する。抗体の可変H (V_H) 及び可変L (V_L) ドメインは、抗原認識に関係しており、この事実はプロテアーゼによる消化実験により最初に認められた。これはさらにげっ歯目の抗体の“ヒト化”により確認された。げっ歯目由来の可変領域をヒト由来の不変領域と融合させて作られた抗体は、母体となったげっ歯目抗体の抗原特異性を保持している (Morrisonら(1984)Proc.Acac.Sci.USA 81,6851-6855)。

50

【0139】

この抗原特異性は可変領域により付与されるものであり、不変領域からは独立していることが、1以上の可変領域のすべてを含む抗体断片をバクテリアで発現させた実験によって知られている。

【0140】

これらの分子にはF a b様の分子(Better et al(1988)Science240、1041)、F v分子 (Skerra et al (1988) Science 240、)、V HとV Lの組となるドメインが柔軟なオリゴペプチドを介して結合している一本鎖F v (S c F v) 分子 (Bird et al (1988) Science 242、423及び Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci.USA 85、5879)及び孤立したVドメインを含む単一ドメイン抗体 (d A b s) (Ward et al (1989) Nature 341、544)を含まれる。抗体断片の合成に関する技術の一般的概要については、Winter & Milstein (1991)Nature 349 293-299に記載されている。

10

【0141】

“S c F V分子”とは、V HとV Lの組となるドメインが柔軟なオリゴペプチドを介して結合した分子を意味する。

【0142】

完全体の抗体に対して抗体断片の優位性は数倍にもなる。より小さなサイズの断片は例えば固体組織への浸透性などの薬理学的な特性を改善するかもしれない。また、補体結合などの抗体全体の効果または影響は取り除かれる。F a b、F v、S c F vおよびd A b抗体断片はすべて大腸性菌により発現及び分泌させることができるので、容易に大量生産することができる。

20

【0143】

完全体の抗体、及びF (a b')₂断片は“2価”である。“2価”とは、抗体及びF (a b')₂断片が2の抗原結合部位を持つことを意味する。対照的に、F a b、F v、S c F v及びd A b断片は1価であり、1の抗原結合部位を持つ。

【0144】

第6の側面としての本発明は、イヌがC R C Vに曝されたかどうかを決定する方法である。前記方法は、イヌから好適な試料を得ることと、前記試料中のC R C Vまたは抗C R C V抗体を特定すること、を有する。前記方法はイヌがC I R Dに感染しているかどうかを診断する補助としても良い。

30

【0145】

本発明は、イヌから得た試料において、そのイヌが過去にC R C Vに曝された経歴を検出する方法を包含し、前記方法はイヌから好適な試料を得ることと、前記試料中に抗C R C V抗体を特定することを、有する。

【0146】

好ましい実施例のひとつとして、前記好適な試料は血清、唾液、気管洗液または細気管支洗液などのあらゆる抗体含有試料であって良い。

【0147】

好ましくは、抗C R C V抗体はB C V、H C V、H E VまたはC R C V抗原を用いて検出され、より好ましくはB C VまたはC R C V抗原を用いて検出される。

40

【0148】

より好ましくは、試料における抗C R C V抗体の特定は、C R C VのSタンパクのアミノ酸配列(図4及びS E Q I D N o. 4)と少なくとも75%の同一性をもつアミノ酸配列のSタンパク、B C VのSタンパク(Genbankアクセス番号A F 0 5 8 9 4 2)のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性をもつアミノ酸配列のSタンパク、H C VのSタンパク(Genbankアクセス番号L 1 4 6 4 3)、B C VのSタンパク(Genbankアクセス番号A F 0 5 8 9 4 2)と少なくとも75%の同一性をもつSタンパクを有するコロナウイルスまたはその断片、またはC R C VのSタンパクと少なくとも75%の同一性を持つSタンパクを含むコロナウイルスもしくはその断片と選択的に結合する抗体を特定することを有する。

50

【0149】

より好ましくは、BCVのSタンパクのアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性をもつアミノ酸配列のSタンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、BCVのSタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）のアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の同一性をもつアミノ酸配列のSタンパク、またはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【0150】

より好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定すること、とは、BCVのSタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）と選択的に結合する抗体を特定すること

10

【0151】

より好ましくは、CRCVのSタンパクのアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性をもつアミノ酸配列のSタンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、CRCVのSタンパクのアミノ酸配列（図4及びSEQ ID No. 4）と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の同一性をもつアミノ酸配列のSタンパク、またはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【0152】

より好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定すること、とは、本発明の第1の側面のCRCVまたはCRCV様のSタンパクと選択的に結合する抗体を特定することを

20

【0153】

最も好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定すること、とは、図4（SEQ ID No. 4）に示すCRCVのSタンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定することを有する。

【0154】

同様に、試料における抗CRCV抗体を特定する、とは、CRCVのHEタンパクの部分アミノ酸配列（図14及びSEQ ID No. 22）と少なくとも90%の同一性を持つアミノ酸配列のHEタンパクと、BCVのHEタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）の部分アミノ酸配列またはHECVのHEタンパク（Genbankアクセス番号L07747）と少なくとも90%の同一性を持つアミノ酸配列のHEタンパクと、BCVのHEタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）と少なくとも90%の同一性を持つSタンパクを含むコロナウイルスと、もしくはその断片と、またはCRCVのHEタンパクと少なくとも90%の同一性を持つHEタンパクを含むコロナウイルスまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有していても良い。

30

【0155】

より好ましくは、BCVのHEタンパクのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を持つアミノ酸配列のHEタンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、BCVのHEタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）のアミノ酸配列と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性を持つアミノ酸配列のHEタンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を

40

【0156】

より好ましくは、試料における抗CRCV抗体の特定とは、BCVのHEタンパク（Genbankアクセス番号AF058942）と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【0157】

さらにより好ましくは、CRCVのHEタンパクのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を持つアミノ酸配列のHEタンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、CRCVのHEタンパク（図13）の部分アミノ酸配列と少なくとも91%、少なくとも9

50

2%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性を持つアミノ酸配列のHEタンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【0158】

さらに好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定することが、本発明の第3の側面に規定されるCRCVまたはCRCV様のHEタンパクに選択的に結合する抗体を特定することを有する。

【0159】

最も好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定することが、図14 (SEQ ID No. 22) に示す部分アミノ酸配列のCRCVのHEタンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定することを有する。

10

【0160】

本発明は、イヌから得た試料においてCRCVを検出する方法を包含し、前記方法はイヌから好適な試料を得ることと、前記試料中にCRCVを特定することを、有する。

【0161】

当然ながら、異なるCRCVの単離物の間にはある程度の自然発生した配列の変化があってよい。従って本発明は、CRCV単離物であり、そのS、pol、及びHEの遺伝子及びタンパクの配列が図1から4、13及び14に示す配列からある程度変化したCRCV単離物を特定することを包含する。しかしながら、当然そうしたCRCVの変体単離物の検出には、図1から4、13及び14に示す配列を特徴とする単離物の検出と同じ方法が用いられる。

20

【0162】

好ましい実施例では、肺洗液、気管洗液、扁桃腺の綿棒採取標本またはイヌの気管から得た生検もしくは死後の試料が好適な試料である。

【0163】

本実施例において、CRCVの特定は、好ましくはCRCVの核酸構成物を特定することを有する。

【0164】

これは、典型的には、例えば実施例1に記載されるようにRNAを試料から抽出してcDNAを得ることにより行われる。次いで、例えば高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション、特異的な増幅、及び核酸のシーケンスを使った、当業者によく知られる方法 (Sambrook et al (2001) supra) を用いてCRCVの核酸構成物をcDNAにおいて特定する。

30

【0165】

好ましくは、CRCVを特定することが、LY138系統のゲノム (Genbankアクセス番号AF058942) やその一部分などのBCVゲノムと高度にストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを特定することを有する。

【0166】

また好ましくは、CRCVの特定は、CRCVのS、polまたはHEポリヌクレオチド (図1、3及び13) やその一部分と高度にストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを特定することを有する。

40

【0167】

“高度にストリンジェントな条件でハイブリダイズする”とは、ハイブリダイズするポリヌクレオチド及び核酸が、非常にストリンジェントな条件下でもハイブリダイズするのに十分な塩基配列の類似性を持っていることを意味する。本技術分野で周知であるように、核酸のハイブリダイズの厳密性は、ハイブリダイズする核酸の長さ、ハイブリダイズする配列の同一性などや、温度、イオン強度、配列のCGまたはAT含有量などの要素によって決まる。

【0168】

CRCVのcDNA分子と高い厳密性でハイブリダイズする核酸としては、CRCVの

50

cDNAの少なくとも一部分において>90%の配列同一性、このましくは>95%、>96%、>97%、>98%、より好ましくは>99%の配列同一性を持つ核酸が挙げられる。

【0169】

選択的なハイブリダイゼーションとなる高度にストリンジェントなハイブリダイズの条件は、典型例が公知であり、例えば参照として組み込まれるSambrook et al 2001 (supra)に記載の条件がある。

【0170】

以下は、核酸がナイロンメンブレン上に固定され、プローブ核酸が500塩基以上の場合の典型的なハイブリダイズ溶液の例である。

6×SSC (クエン酸ナトリウム食塩水)

0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

100 μg/mlの変性、断片化サケ精子DNA

【0171】

ハイブリダイゼーションは68℃で行う。核酸が固定されているナイロンメンブレンは68℃の0.1×SSCで一度洗浄しても良い。

【0172】

20×SSCは、以下のように調製しても良い。800 mlのH₂Oに175.3 gのNaClと88.2 gのクエン酸ナトリウムを溶解する。10 Nの水酸化ナトリウムの液滴でpHを7.0に調整する。H₂Oで体積を1リットルに調整する。一定分量に分注する。オートクレーブにより滅菌する。

【0173】

以下は、核酸がナイロンメンブレン上に固定され、プローブ核酸が15から50塩基の場合の典型的なハイブリダイズ溶液の例である。

3.0 M塩化トリメチルアンモニウム (TMACl)

0.01 Mリン酸ナトリウム (pH 6.8)

1 mM EDTA (pH 7.6)

0.5% SDS

100 μg/mlの変性、断片化サケ精子DNA

0.1%脱脂粉乳

【0174】

ハイブリダイズに最適な温度としては、所定の鎖長に対するT_iより5℃低い温度が通常選択される。T_iとは、プローブとその標的となる配列との間に形成されたハイブリッドの不可逆な解離温度である。Jacobs et al (1988) Nucl. Acids Res. 16, 4637では、T_iの算定について議論されている。3 MのTMAClにおける17量体のハイブリダイズ温度としては、48–50℃が推奨される。19量体では55–57℃、20量体では58–66℃である。

【0175】

好ましくは、CRCVを特定することが、BCVゲノム (Genbankアクセス番号AF058942)の一部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチドを用いることを有する。

【0176】

より好ましくは、CRCVを特定することが、CRCVのSポリヌクレオチド (図3)の一部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチド、またはCRCVのpolヌクレオチド (図1)の一部分と少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチド、またはCRCVのHEポリヌクレオチド (図13)と少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチドを用いることを有する。

【0177】

より好ましくは、CRCVを特定することは、上記の本発明の第4の側面で規定される

10

20

30

40

50

CRCVポリヌクレオチドを特定することを有する。

【0178】

最も好ましくは、CRCVを特定することが、図1、図3もしくは図13に示される配列、またはそれらの断片を有する、またはのみからなるCRCVポリヌクレオチドを特定することを有する。

【0179】

他の好ましい実施例としては、CRCVを特定することが、CRCVのタンパク構成物を特定することを有する。

【0180】

好ましくは、CRCVのタンパク構成物を特定することが、上記本発明の第1、第2または第3の側面に規定されるCRCVタンパクを特定することを有する。

10

【0181】

最も好ましくは、CRCVのタンパク構成物を特定することが、図2、図4もしくは図14に示されるアミノ酸配列、またはそれらの断片を有する、またはのみからなるCRCVタンパクを特定すること有する。

【0182】

生物試料におけるCRCVのタンパク構成物のアッセイはあらゆる公知の方法により行うことができる。生物試料におけるCRCVタンパクレベルでのアッセイには、抗体を用いる技術が好適である。

【0183】

20

好ましくは、CRCVのタンパク構成物を特定することは、CRCVに反応する抗体を用いることを有する。

【0184】

より好ましくは、CRCVに反応する抗体とは、本発明の第5の側面の方法により得られた、または得ることのできる抗BCV抗体、抗HCV抗体、抗HEV抗体、または抗CRCV抗体である。

【0185】

例えば、CRCVのタンパク発現は、古典的な免疫組織学的方法により研究することができる。この方法において、一次抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）により特異的な認識が行われるが、二次の検出系には蛍光、抗体、またはその他の複合二次抗体を利用することができる。結果として、病理学的な検査を目的とした組織切片の免疫組織学的な染色が得られる。またウエスタンブロットまたはドット／スロットアッセイのために、組織を例えば尿素または中性界面活性などで抽出し、CRCVタンパクを遊離させることができる（Jalkanen, M., et al, J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)）。この方法は陽イオン性の固相を用いるものであるが、単離したCRCVタンパクを基準として用いることでCRCVタンパクを定量することができる。この方法は体液試料にも適用することができる。

30

【0186】

その他のCRCVタンパクの発現を検出するのに有用な抗体を用いた方法としては、酵素結合抗体吸着検定法（ELISA）及び放射免疫検定法（RIA）などの免疫学的検定法が挙げられる。例えば、CRCVに反応するモノクローナル抗体は、免疫吸着剤、及びCRCVタンパクを検出、定量する酵素標識プローブのどちらとしても用いることができる。試料中に存在するCRCVタンパクの量は、標準試料に存在する量を参照すればコンピューターアルゴリズムによる直線回帰を用いて計算することができる。腫瘍の抗原を検出するためなどのELISAが、Iacobelli et al, Breast Cancer Research and Treatment 11: 19-30 (1988)に記載されている。その他のELISA法としては、2の異なる特異モノクローナル抗体を体液中のCRCVタンパクを検出するのに用いることができる。この方法では、抗体のひとつは免疫吸着剤として用いられ、他の抗体は酵素標識したプローブとして用いられる。

40

【0187】

50

上記の方法は“１段階”または“２段階”の方法として行って良い。“１段階”の方法には、CRCVタンパクを固定した抗体に接触させることと、洗浄せずにそのまま標識した抗体に混合物に接触させることが含まれる。“２段階”の方法には、標識した抗体に混合物を接触させる前の洗浄することが含まれる。その他の従来の方法も適宜採用して良い。一般的には、アッセイ系の一構成要素を支持体上に固定して、そうして系の他の構成要素をその構成要素と接触させ、試料から除去できるようにすることが望ましい。

【0188】

好適な酵素標識としては、例えば基質と反応して水素ペルオキシダーゼの産出を触媒するオキシダーゼ類が挙げられる。グルコースオキシダーゼは、その安定性と基質（グルコース）が容易に入手できることから特に好ましい。オキシダーゼ標識の活性は、酵素標識された抗体と基質の反応により形成された水素ペルオキシダーゼの濃度を測定することによりアッセイしても良い。酵素の他にも、他の好適な標識としては、ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In ）及びテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）などの放射性同位体、フルオレセイン、ローダミンなどの蛍光標識、及びビオチンなどが挙げられる。

【0189】

第7の側面としての本発明は、抗CRCVのSまたはHE抗体を検出するための抗体吸着法である。この方法は、本発明の第1もしくは第3の側面に規定されるか第4の側面方法に用いて得られるCRCVもしくはCRCV様のSもしくはHEタンパク、またはCRCVもしくはCRCV様のS及びHEタンパクの両方、あるいは抗原性のあるそれらの断片でコーティングされた固相を有し、当該固相に曝された試料中の抗CRCVのSまたはHE抗体はタンパクに結合し、検出可能な標識複合体は固相に結合した抗CRCV抗体に結合する。

【0190】

固相をコーティングするCRCVまたはCRCV様のSタンパクの抗原性の断片が、抗CRCVのS抗体と結合するのに十分な大きさで、少なくとも1の表1に示すCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有することが好ましい。

【0191】

また、固相をコーティングするCRCVまたはCRCV様のHEタンパクの抗原性の断片が、抗CRCVのHE抗体と結合するのに十分な大きさで、上記で規定されるCRCVのHEタンパクに特異的な3のアミノ酸の少なくとも1を有することが好ましい。

【0192】

好ましくは、固相をコーティングするCRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、少なくとも10のアミノ酸長である。より好ましくは、CRCV、CRCV様のSタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、または少なくとも400のアミノ酸長である。CRCV、CRCV用のSタンパクは少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、または少なくとも1000のアミノ酸長である。

【0193】

好ましくは、固相をコーティングするCRCV、CRCV様のSタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は1200未満のアミノ酸長である。より好ましくは、CRCV、CRCV様のSタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、1100未満、1000未満、900未満、800未満、700未満、600未満、または500未満のアミノ酸長である。CRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、400未満、300未満、200未満、100未満、または50未満のアミノ酸長であってよい。

【0194】

好ましくは、固相はマイクロタイターウェルである。

【0195】

また、好ましくは複合体は抗イヌ抗体を有する。

【0196】

好ましくは複合体は例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼである酵素を有する。また、好ましくは免疫吸着法は酵素の基質も有する。

【0197】

好適な免疫吸着法及びELISA法の詳細は上述のとおりである。

【0198】

本発明には免疫吸着法の構成物を含むようなキットも含まれる。キットには、マイクロタイタープレートなどの固相、固相をコーティングするCRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパクまたはその両方、及び固相に結合した抗CRCV抗体に結合する検出可能な抗イヌ抗体などの標識複合物が含まれていても良い。検出可能な標識複合物が酵素の場合、キットには当該酵素の基質も含まれる。またキットには、本発明の第5の側面において記載されるような抗CRCVのSまたはHEタンパク抗体を含有するポジティブコントロール試料、及びネガティブコントロール試料が含まれていても良い。

10

【0199】

従って本発明には、抗CRCVのSまたはHE抗体またはその両方を補足するためであって、本発明の第1もしくは第3の側面に規定されるか第4の側面の方法を用いて得られるCRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパク、または抗原性のあるそれらの断片が固着された固体基質が含まれ、当該固相に曝された試料中の抗CRCVのSまたはHE抗体はSまたはHEタンパクに結合する。

20

【0200】

典型的には、タンパクは抗原の安定性により4℃から37℃で一晩マイクロタイタープレート上にコーティングされる。結合しなかったタンパクをリン酸緩衝生理食塩水やトリス緩衝生理食塩水などの緩衝液で洗浄する。血清またはその他の試料を、典型的には37℃で1～数時間プレート上でインキュベートする。結合しなかった材料を洗浄し、プレートを酵素標識した（例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ）抗体（例えば血清試料に対しては抗イヌIgG、IgMまたは肺洗液に対しては抗イヌIgA）で37℃で1～数時間インキュベートする。結合しなかった抗体を洗浄し、プレートをOPDなどの基質で10分インキュベートし、光学的な濃度を光度計で測定する。

30

【0201】

好ましくは、固体基質はマイクロタイターウェルである。

【0202】

本発明としての第8の側面は、イヌの予防接種用のワクチン構成物であって、(i) CRCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(ii) BCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(iii) CRCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(iv) BCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(v) CRCVタンパクと少なくとも75%の同一性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vi) BCVタンパクと少なくとも75%の同一性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vii) 前記コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片をコードする核酸、を有する。

40

【0203】

好ましくは、ワクチンはイヌ用として作られ、供される。

【0204】

ワクチンがコロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片を有する場合、前記タンパクはBCVまたはCRCVタンパクの対応する部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つ。

50

【0205】

好ましくは、コロナウイルスタンパクはBCV、HCV、HECもしくはCRCVタンパク、またはそれらの改変物である。

【0206】

改変物としては、典型的にはワクチンの抗原性を改善するようなアミノ酸置換が挙げられる。BCV、HCV及びHEVタンパクは、よりCRCVに近くなるよう改変しても良い。例えば、BCV、HCVまたはHEVのスパイクタンパクは図10において比較されるまたは表1に示される相違部分がCRCVのアミノ酸となるように改変されていても良い。さらに、または代わりとして、BCV、HCVまたはHEVのHEタンパクは上記の3のCRCV特異的な残基がCRCVのアミノ酸となるように改変されていても良い。

10

【0207】

1以上のアミノ酸残基が化学的に修飾されたタンパクは、そのタンパクの機能、すなわち生体内において特異抗体を産生させること、が実施的に変化せずに保持されているのであれば、用いても良い。合成タンパクは、合成前または合成後に適宜修飾されていることが好ましい。そのような修飾としては、酸または塩基（特に生理学的に許容できる有機または無機の酸または塩基）との塩の形成、末端カルボキシ基のエステルまたはアミドの形成、及びN-tert-ブトキシカルボニルなどのアミノ酸保護基の付加などが挙げられる。そのような修飾は、生体内での代謝からポリペプチドを保護するものであって良い。

【0208】

前記タンパクは単一コピーまたはタンデム反復などの複数体として存在してよい。タンデムや複数の反復は、それ自体が十分に抗原性であり、キャリア使用しなくても良いかもしれない。タンパクは、N末端とC末端が互いに結合して環状となっていたり、抗原性が増したりジスルフィド結合が形成できるように末端に1以上のCys残基が付加されていれば有利である。タンパクがキャリアと共有結合（好ましくはポリペプチド）していれば、本発明のタンパクが環状に形成されるような配列が好ましい。

20

【0209】

現在の免疫学的理論によれば、あらゆる免疫原形成において、キャリアには免疫系を刺激したり刺激を増幅したりするキャリアの機能が存在するはずである。T細胞エпитープが組み込まれた（または抗原と共にT細胞エпитープをつくる）キャリアが最も良いと考えられている。ペプチドは、例えば架橋により、血清アルブミン、ミオグロビン、微生物変性毒素及びキーホールリンペットヘモシアニンといったキャリアと結合している。免疫応答におけるT細胞ヘルプを含む最近開発されたキャリアには、B型肝炎コア抗原（ヌクレオカプシド抗原とも呼ばれる）、Thr-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Glu-Thr-Thr-Asn-Cys (SEQ ID NO. 52)などのT細胞推定エпитープ、ベータガラクトシダーゼ、及びインターロイキン-1のペプチド163-171が含まれる。後者の物質は、キャリアもしくはアジュバント、またはその両方として様々に解釈されて良い。もしくは、同一のまたは異なる種類の本発明のタンパクを数コピー分互いに架橋したものであって良い。この場合、独立したキャリアは存在しないが、架橋によってキャリアの機能を果たされる。好適な架橋剤としては、シグマやピアスのカタログに記載されるようなものが挙げられ、例えばグルタルアルデヒド、カルボジイミド、コハク酸イミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩であり、後者の試薬はC末端のシステイン残基（あれば）の-SH基を利用する。

30

40

【0210】

タンパクが好適な塩基配列を好適な宿主において発現させることにより調製する場合、キャリアとして作用するペプチド配列との融合体として発現させるのが有利である。Kabi genの“Ecosec”システムがそのような取り合わせの例である。

【0211】

ワクチンのコロナウイルスの構成物が他の抗原と結合して二重の効果を奏するものであっても良い。

【0212】

50

好ましくは、ワクチン構成物におけるコロナウイルスタンパクはSタンパクである。より好ましくは前記Sタンパクは、上記本発明の第1の側面に規定されるか第4の側面の方法を用いて得られるCRCV、CRCV様のSタンパク、BCVのSタンパク、HCVのSタンパク、HEVのSタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片である。

【0213】

最も好ましくは、ワクチン構成物は図4に示すアミノ酸配列を含むまたはのみからなるCRCVのSタンパク、または図4に示すアミノ酸配列と少なくとも97%の同一性を持ち、免疫原性のあるその断片を含む。好ましくは、前記変体は図4に記載の配列と少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸同一性を持つ。より好ましくは、前記変体は図4に記載の配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸同一性を持つ。

10

【0214】

さらに、またはもしくは、前記ワクチン構成物は、血球凝集素－エステラーゼタンパク(HE)、膜内在タンパク(M)、または小膜タンパク(E) (Lai MMC & Cavanagh D, (1997) "The molecular biology of coronaviruses" Adv.Vir.Res, 48: 1-100)を有していても良い。

【0215】

実施例のひとつとして、HE、EまたはMタンパクはBCV、HCVまたはHEVタンパクである。他の実施例として、HE、EまたはMタンパクはCRCVタンパクである。

20

【0216】

好ましくは、前記HEタンパクは上記本発明の第3の実施例で定義されるか、第4の側面の方法によって得られるCRCV、CRCV様のHEタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片である。

【0217】

より好ましくは、前記ワクチン構成物は図14に示す部分アミノ酸配列を有する、もしくはのみからなるCRCVのHEタンパク、または免疫原性のあるその断片で図14に示す配列と少なくとも97%の同一性を持つものを含む。好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸同一性を持つ。より好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸同一性を持つ。

30

【0218】

ワクチンがコロナウイルスを有する場合、好ましくはコロナウイルスはBCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを有する。より好ましくは、前記コロナウイルスは、CRCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを有する。

40

【0219】

さらに、またはもしくは、ワクチンがコロナウイルスを含む場合、好ましくはコロナウイルスはBCVのHEタンパクと、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つ。より好ましくは、前記コロナウイルスはCRCVのHEタンパクと少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを有する。

【0220】

その他の好ましい実施例では、ワクチン構成物はBCV、HCV、HEV及びCRCV、またはその改変物を有する。

【0221】

50

イヌウイルスに対して効果のあるイヌワクチンは非イヌウイルス由来であることが好ましい。例えば、US Patent No. 5,750,112 (Gillが発明しSolvay Animal Health社に譲渡、)は、不活化したネコ科腸性コロナウイルスを含むイヌ腸性コロナウイルスに対するワクチンを開示している。US 5,750,112の開示内容は本願に参照により組み込まれる。

【0222】

好ましい実施例のひとつとして、前記ウイルスは不活化したウイルスである。ワクチンとしての使用するためのウイルスの不活化の方法は周知である。好適な方法としては、例えばベータプロピオラクトン (BPL) などを使用する化学的な方法が挙げられる。好適な不活化したウシコロナウイルスのワクチンは、不活化したBCVを含んでもよく、例えば"Rotovet Corona" (シェーリングプラウ、<http://www.ukvet.co.uk/rotovec/scour.htm>)、"Lactovac" (Hoechst Roussel Vet社、(Veterinary Formulary 5th Edition of the Veterinary Data Sheet Compendium))、"First Defense" (Immuncell社、アメリカ)；"Scour Bos 4" (Grand Laboraotries) 及び"Scour Guard 3K" (ファイザー) が挙げられる。

10

【0223】

その他の実施例として、前記ウイルスは弱毒化したウイルスである。ワクチンとしての使用するためのウイルスの弱毒化の方法は周知である。

【0224】

好ましくは、ワクチン構成物は医薬として可能なアジュバントも有する。

【0225】

好ましくは、ワクチンが核酸を含む場合、ワクチンとして用いられるコロナウイルスタンパクや免疫原性のあるその断片をコードする核酸は、CRCV、CRCV様のSポリヌクレオチド、またはCRCV、CRCV様のHEポリヌクレオチド、またはCRCV、CRCV様のS及びHEポリヌクレオチドの両方である。より好ましくは、前記核酸は図3もしくは図13に記載の塩基配列、またはその断片を有する、またはのみからなる。

20

【0226】

ワクチンとしての使用のため、CRCVまたはCRCV様のSまたはHE核酸は、様々な複製 (例えば組み換えアデノウイルスワクチン) または非複製 (DNAワクチン) ベクターにより運ばれるものであってよい。

【0227】

好ましい実施例としては、ワクチンはHEタンパクなどの他の免疫原性のコロナウイルスの他にも組み換えCRCV、CRCV様のSタンパクを含んでいて良い。

30

【0228】

上述したように、数種のウイルス及び細菌がイヌの呼吸器疾患に関わっていることが知られており、イヌパラインフルエンザウイルス (CPIV)、イヌアデノウイルス2型 (CAV-2)、イヌヘルペスウイルス (CHV) 及びBordetella bronchiseptica(B. bronchiseptica)が知られている。

【0229】

その他の好ましい実施例として、ワクチンにはイヌパラインフルエンザウイルス、イヌアデノウイルス2型、Bordetella bronchiseptica(B. bronchiseptica)、イヌヘルペスウイルス、ヒトレオウイルス及びマイコプラズマ類、または免疫原性のあるこれら由来のタンパクの他にも、組み換えCRV、CRCV様のSまたはHEタンパクを含んでいても良い。従って、ワクチンは免疫応答、例えばCPIV、CAV-2、B.bronchiseptica及びCHVなどの呼吸器疾患に関係する病原体と同様にCRCVに対する抗体の産生を起こさせることのできる試薬を含むものであって良い。

40

【0230】

実施例として、ワクチン構成物はCRCV、CRCV様のSまたはHEタンパクなどのCRCVに対する抗体の産生を刺激することのできる試薬を含むことに加えて、以下のいずれか1以上をさらに有するものであって良い。

(a) イヌにおいてCPIVに対する免疫応答を起こすことのできる試薬。

50

(b) イヌにおいてC A V-2に対する免疫応答を起こすことのできる試薬。

(c) イヌにおいてC H Vに対する免疫応答を起こすことのできる試薬。

(d) イヌにおいてB. bronchisepticaに対する免疫応答を起こすことのできる試薬。

【0231】

従って、ワクチン構成物はこれらの追加試薬(a)、(b)、(c)及び(d)のいずれか2、3または4種すべてを適宜有することができる。

【0232】

典型的には、イヌにおいてC P I Vに対する免疫応答を起こすことのできる試薬は、不活化、弱毒化したC P I V、免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

10

【0233】

典型的には、イヌにおいてC A V-2に対する免疫応答を起こすことのできる試薬は、不活化、弱毒化したC A V-2、免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

【0234】

イヌアデノウイルス1型は感染性肝炎を引き起こし、イヌアデノウイルス2型は呼吸器疾患を引き起こす。C A V-1はC A V-2に対して相互に交差防御されることが示されている。従って、イヌにおいてC A V-2に対して免疫応答を起こす試薬は、C A V-1またはC A V-2のどちらか、または免疫原性のあるその断片を含んでも良い。以下に示すワクチンはEURICAN DHPPiを除いてC A V-2を含んでおり、使用されるウイルス型を特定しない。

20

【0235】

イヌにおいてC P I V及びC A V-2に対して免疫応答を起こすのに好適な試薬は、当業者に公知である。例えば、以下のイヌワクチンがイギリスにおいて認可されている。

【0236】

Fort Dodge Animal HealthのKAVAK DA₂PiP69は、組織培養より得たイヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパラインフルエンザ2型、及びイヌパルボウイルスの弱毒系統を含む、生凍結乾燥ワクチンである。

【0237】

Fort Dodge Animal HealthのKAVAKパラインフルエンザは、同一の樹立細胞株を培養して得たイヌパラインフルエンザ2型の弱毒系統由来の生凍結乾燥ワクチンである。

30

【0238】

Intervet UK社のNOBIVAK DHPPiは、組織培養下細胞株より得たイヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパルボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルスを含む、弱毒化生凍結乾燥ワクチンである。

【0239】

Intervet UK社のNOBIVAC KCは、Bordetella bronchiseptica系統B-C2及びイヌパラインフルエンザウイルス系統Cornellを含む改変された生ワクチンである(これは鼻腔内ワクチンである)。管理許可番号Vm06376/4026。

【0240】

40

Merial Animal Health社のEURICAN DHPPiは、イヌジステンパー、イヌ感染性肺炎、イヌパルボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルス2型に対する複合生凍結乾燥ワクチンである。

【0241】

ファイザー社のVANGUARD7は、樹立細胞株で増殖させた弱毒化した生のイヌジステンパーウイルス(SnyderHill系統)、アデノウイルス(CAV-2 Manhatta系統)、パラインフルエンザウイルス(NL-CPI-5系統)、イヌパルボウイルス(NL-35-D)、並びにLeptospira canicola及びLeptospira icterohaemorrhagiaeの不活化培養物を含む。

【0242】

シェーリングプラウAnimal HealthのQUANTUM DOG7は、イヌジステンパー、アデノウイ

50

ルス2型、パラボウイルス、パラインフルエンザウイルス2型のワクチン（生）及び不活化した*Leptospira canicola*及び*Leptospira icterohaemorrhagiae*のワクチンを含む。

【0243】

Virbac社のCANIGEN DHPPiは、組織培養した細胞株より得たイヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス（CAV2）、イヌパラボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルスを含む弱毒化生凍結乾燥ワクチンである。

【0244】

Virbac社のCANIGEN Ppiは、細胞株を組織培養して得られたイヌパルボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルスを含む弱毒化生凍結乾燥ワクチンである。

【0245】

典型的には、イヌにおいてCHVに対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は、不活化、弱毒化したCHV、または免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

【0246】

イヌにおいてCHVに対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は当業者に公知である。例えば、MerialのEURICAN Herpes205は、イヌヘルペスウイルスに対する精製サブユニットワクチンであり、妊娠したメスの能動免疫に用いられて、子犬が生後1日目からイヌヘルペスウイルスに感染することで死んだり、臨床的な症状や傷害を示したりするのを防ぐものである。しかし、成犬の呼吸器疾患に対しての免疫には許可されていない。

【0247】

典型的には、イヌにおける*B. bronchiseptica*に対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は、不活化、弱毒化した*B. bronchiseptica*、または免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

【0248】

イヌにおいて*B. bronchiseptica*に対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は当業者に公知である。例えば、以下のイヌワクチンが使用許可されている。

【0249】

ファイザーAnimal HealthのCOUGHGUARD-B（登録商標）（U.S.Vet.Lic.No.:189）は、*B. bronchiseptica*の不活化した培養物を含む。これは、*B. bronchiseptica*により引き起こされる病気、特にケンネルコフの予防として健康なイヌの免疫に用いられる。COUGHGUARD-B（登録商標）は、*B. bronchiseptica*の不活化された抗原性の高い系統から調製され、イヌに投薬する際に無毒化される。*B. bronchiseptica*の免疫原特性を完全なまま残す製造方法が報告されている。

【0250】

ファイザーAnimal HealthのVANGUARD（登録商標）5/B（U.S.Vet.Lic.No.:189）は、イヌの樹立細胞株で増殖させたイヌジステンパーウイルス（CDV）、CAV-2、CPV及びイヌパラボウイルス（CPV）の弱毒系統を含む。CPV抗原はイヌ細胞株の低い継代（low passage）によって弱毒化されるが、移行抗体に勝ることのできる免疫原特性を持つ継代レベルとする。ワクチンは凍結乾燥され不活性ガスで充填された状態で包装される。不活化した*B. bronchiseptica*の全培養物を含む細菌ワクチンの構成物であり、希釈液として供される。VANGUARD（登録商標）5/Bの*B. bronchiseptica*成分は、不活化された免疫原性の高い系統をイヌに投薬する際に無毒化して調製される。

【0251】

ファイザーAnimal HealthのNASAGUARD-B（商標）（U.S. Vet. Lic. No.: 112）は、*B. bronchiseptica*の無毒性の生培養物からなる。

【0252】

IntervetのPROGARD（登録商標）-KCは、弱毒イヌパラインフルエンザウイルス及び*B. bronchiseptica*の無毒性の生培養物を含む鼻腔投与型の改変生ワクチンである。PROGARD（登録商標）-KCは、最溶解用の滅菌希釈液と共に乾燥粉末の状態で供される。PROGARD（登録商標）-KCは、イヌパラインフルエンザウイルス及び*B. bronchiseptica*によるイヌの感

10

20

30

40

50

染性気管気管支炎（“ケンネルコフ”）の予防として、健康な感染しやすい子イヌおよびイヌの免疫に用いられる。

【0253】

IntervetのPROGARD（登録商標）-KC PLUSは、B. bronchisepticaの無毒系統、弱毒イヌアデノウイルス2型及びパラインフルエンザウイルスを含み、鼻腔投与用である。PROGARD（登録商標）-KC Plusを投与すると、気管において即応性の局所的な免疫が活性化し、臨床的症状を予防するだけでなく、初期の感染が抑制される。局所的な免疫に加えて、鼻腔投与から3週間以内に全身の免疫も活性化する。PROGARD（登録商標）-KC Plusの少量（0.4ml）で1回の鼻孔投与であるため、特に少ない血統や若い子犬に対して、容易に予防接種することができる。PROGARD（登録商標）-KC Plusは、最溶解用の滅菌希釈液と共に乾燥粉末の状態で供される。PROGARD（登録商標）-KC Plusは、イヌアデノウイルス2型、パラインフルエンザウイルス及びB. bronchisepticaによるイヌ感染性気管気管支炎（“ケンネルコフ”）の予防として、健康なイヌ及び3週齢以上子犬の免疫に用いられる。

10

【0254】

IntervetのIntracは、B. bronchisepticaのS55系統を含む凍結乾燥した改変生ワクチンであり、鼻孔投与用である。製品許可番号はPL0201/4011である。

【0255】

上記のNovivacKCもまた、B. bronchisepticaを含んでいる。

20

【0256】

予防接種は特に犬舎に入れる前のイヌ、または繁殖施設のイヌの予防接種として特に有用であるが、それだけに限られるものではない。

【0257】

組み換えタンパクからなるワクチンの典型的な投与量は5～10μgである。不活化ウイルスからなるワクチンの典型的な投与量は1～10mgである。

【0258】

第9の側面としての本発明は、イヌのCRCVに対する免疫応答を刺激するための薬剤の調製における、(i) CRCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(ii) BCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(iii) CRCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(iv) BCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(v) CRCVタンパクと少なくとも75%の同一性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vi) BCVタンパクと少なくとも75%の同一性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vii) 前記コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片をコードする核酸、の使用である。

30

【0259】

本発明は、イヌにおける呼吸器疾患、典型的にはCIRDの予防のための薬剤の調製における、(i) CRCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(ii) BCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(iii) CRCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(iv) BCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(v) CRCVタンパクと少なくとも75%の同一性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vi) BCVタンパクと少なくとも75%の同一性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vii) 前記コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片をコードする核酸、の使用である。

40

【0260】

50

コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片が薬剤の調製に用いられる場合、前記タンパクはBCVタンパクの対応する部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つ。好ましくは、前記タンパクはCRCVタンパクの対応する部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つ。

【0261】

好ましくは、薬剤の調製に使用されるコロナウイルスタンパクは上述の第8の側面におけるBCV、HCV、HEVもしくはCRCVタンパク、またはその改変物である。

【0262】

より好ましくは、薬剤の調製に用いられるコロナウイルスタンパクはSタンパクである。また好ましくは、前記Sタンパクは、上記本発明の第1の側面に規定されるか第4の側面の方法を用いて得られるCRCV、CRCV様のSタンパク、BCVのSタンパク、HCVのSタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片を有する。

10

【0263】

最も好ましくは、薬剤の調製に用いられるコロナウイルスタンパクは、図4に示すアミノ酸配列、または図4に示すアミノ酸配列と少なくとも97%の同一性を持ち、免疫原性のあるその断片を有するまたはのみからなる。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸配列同一性を有する。

20

【0264】

さらに、またはもしくは、薬剤の調製に使用される前記コロナウイルスタンパクはHE、E、MまたはNコロナウイルスタンパクを有していても良い。実施例のひとつとして、HE、M、またはNタンパクはBCV、HCVまたはHEVタンパクである。他の実施例として、HE、E、M、またはNタンパクはCRCVタンパクである。

【0265】

典型的には、前記HEタンパクは上記本発明の第3の実施例で定義されるか、第4の側面の方法によって得られるCRCV、CRCV様のHEタンパク、BCVのHEタンパク、HCVのHEタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片を有する。

30

【0266】

好ましくは、薬剤の調製に用いられるHEタンパクは、図14に示す部分アミノ酸配列、または免疫原性のあるその断片で図14に示す配列と少なくとも98%の同一性を持つものを有する、またはのみからなる。好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。より好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸同一性を持つ。

40

【0267】

コロナウイルスを薬剤の調製に用いる場合、好ましくはコロナウイルスはBCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つ。より好ましくは、前記コロナウイルスは、CRCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つSタンパクを有していてもよい。

【0268】

さらに、またはもしくは、コロナウイルスはBCVのHEタンパクと少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを有していても良い。より好ましくは、前記コロナウイルスはCRCVのHEタンパクと少なくとも96%、少な

50

くとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸同一性を持つHEタンパクを有する。

【0269】

第10の側面としての本発明は、本発明の第1の側面に規定されるか、第4の側面の方法により得られるCRCVまたはCRCV様のSタンパクで、薬として使用されるものである。典型的には、前記Sタンパクは家畜用医薬として使用される。

【0270】

本発明は、薬として使用される、上記本発明の第3の実施例で定義されるか、第4の側面の方法によって得られるCRCV、CRCV様のHEタンパクを包含する。典型的には、前記HEタンパクは家畜用医薬として使用される。

10

【0271】

第11の側面としての本発明は、CRCVの予防としてイヌに免疫する方法であって、本発明の第9の側面のワクチン構成物をイヌに投与することを有する。

【0272】

典型的には、前記ワクチンは、筋肉、皮下または鼻腔道に投与される。

【0273】

その他の実施例として、CRCVと反応する抗体を投与することで、イヌにCRCVに対する免疫性を受動的に持たせることもできる。CRCVと反応する抗体は抗BCV抗体、抗HCV抗体であって良いが、好ましくは抗CRCV抗体である。好ましくは、CRCVと反応する抗体は抗Sタンパク抗体、抗HEタンパク抗体である。最も好ましくは、CRCVと反応する抗体は、本発明の第5の側面に記載される抗CRCVのSまたはHEタンパク抗体である。

20

【0274】

第12の側面としての本発明は、イヌの間におけるCRCVの蔓延と戦う方法であり、上記本発明の第6の側面に記載される方法、または上記本発明の第7の側面に記載される免疫吸着法または固体基質を用いることによってイヌがCRCVに感染しているかどうかを判断すること、及びイヌがCRCVに感染しているのであればそのイヌを隔離すること、を有する。

【0275】

イヌを“隔離する”とは、そのイヌを他のすべてのイヌから引き離した状態にすることを意味を含む。また、そのイヌをCRCVに対する予防接種をしていない他のすべてのイヌから引き離した状態にするという意味も含んでおり、これは上述するように実施することができる。そのイヌをCRCVに感染していない他のすべてのイヌから引き離した状態にするという意味も含んでおり、感染については上記のように判断することができる。

30

【0276】

第13の側面としての本発明は、イヌの間におけるCRCVの蔓延と戦う方法であり、上記本発明の第6の側面に記載される方法、または上記本発明の第7の側面に記載される免疫吸着法または固体基質を用いることによってイヌがCRCVに感染しているかどうかを判断すること、及びイヌがCRCVに感染しているのであれば、そのイヌと接していた、接している、または接しているかもしれない他のイヌに予防接種すること、を有する。

40

【0277】

第14の側面としての本発明は、イヌにおけるイヌ感染性呼吸器疾患(CIRD)の発生を予防したり減少させたりすることのできるテストワクチンを検定する方法である。前記方法は、(a)典型的には上記本発明の第6の側面の方法、または上記本発明の第7の側面の免疫吸着法か固体基質を用いることによって、イヌがCRCVに曝されていたかどうかを決定することと、(b)イヌがCRCVに曝されていなかったのであれば、テストワクチンをイヌに投与することと、(c)イヌにCRCVを接種することと、(d)イヌがCIRDを発症したかどうかを判断すること、を有する。(d)段階においてCIRDが確認されなければ、テストワクチンがCIRDを予防することができることが示される。

50

【0278】

典型的には、この方法は一揃いのイヌに対して実施される。

【0279】

好ましくは、前記方法は、(b)段階においてテストワクチンを投与されないコントロールのイヌを一揃い使用することを含む。テストワクチンを投与したイヌの組におけるCIRDの発症が、コントロールの組よりも有意に低ければ、テストワクチンがCIRDの発症を予防または減少させることができることが示される。

【0280】

本発明は、この方法により検定されるワクチンを含む。

【0281】

本願で引用される文献は、すべてここに参照により完全に取り込まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0282】

以下、本発明を以下の図及び実施例を参照しながら詳細に説明する。

【実施例1】

【0283】

イヌ伝染性呼吸器疾患に関わる新規なコロナウイルスの検出

【0284】

概要

イヌ伝染性呼吸器疾患(CIRD)の原因についての調査を大規模なイヌの救助施設(re-homing kennel)にて行った。罹患したイヌの気管から採取した組織試料について、ポリメラーゼ遺伝子の保存プライマー(conserved primer)によるRT-PCR法を用いて試験した。4つの陽性試料について配列解析したところ新規なコロナウイルスの存在が示され、それらはウシ及びヒトコロナウイルス(OC43系統)の両方について、そのポリメラーゼとスパイクタンパクが高い類似性を示したが、一方でイヌ腸性コロナウイルスの対応する遺伝子とは低い類似性しか持たなかった。このイヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)は、32/119の気管試料及び20/119の肺試料よりRT-PCRにより検出されたが、軽い臨床的症状を示すイヌが最も高い罹患率で検出された。犬舎に入った日にCRCVに対する抗体が存在していた場合、呼吸器疾患を発症する危険が減少することが血清学的な分析により示された。

【0285】

試料と方法

【0286】

研究個体群

本研究では、地域的な呼吸器疾患が発生した経歴のある、大手のイヌ救助施設(re-homing kennel)を調査した。すべてのイヌについて、犬舎に入る際にKAVAK DA₂PiP69(Fort Dodge)(ジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパラインフルエンザウイルス及びイヌパラボウイルスに対する弱毒生ワクチン)を予防接種した。また、レプトスピラ症死菌ワクチンも用いた(Fort Dodge)。各イヌの健康状態について、獣医学臨床医により1日に2度評価して呼吸器の症状を以下のように評定した。1：呼吸器の症状無し、2：弱い咳、3：咳と鼻水、4：咳と鼻水と食欲不振、5：気管支肺炎。イヌの全身的健康状態、は以下のように評定した。1：健康、2：健康でない、3：非常に健康でない。イヌの年齢、血統及び性別を記録した。

【0287】

119匹のイヌに対して、全身の死体解剖を行った。組織試料は、使用に供するまで-70℃で保存した。

【0288】

111匹のイヌについて、イヌ救助施設に入った日に血清試料を採取した。81匹のイヌについては入舎後7日、及び111匹のイヌについては入舎後21日の追跡試料の血清を入手することができた。

【0289】

最初の血清採取から最後の採取までの21日間において、111匹のイヌのうち30匹が健康であったが、81匹のイヌが呼吸器疾患を発症した。

【0290】

他の場所で飼育されていた35匹のイヌの血清を、Royal Veterinary Collegeの診療施設から得た。これらの血清は、種々の理由から生化学的な調査に供されたものである。これらの血清のうちの5つは、呼吸器疾患の経歴のない18月齢のビーグル犬より得たものである。血清は常法に基づき-20℃で保存した。

【0291】

RNAの抽出とRT-PCR

RNAはTriReagent (シグマ) を用いて119匹のイヌの気管及び肺組織から抽出した。約25-50mgのホモジナイズした試料を用い、取扱説明書の推奨にならってRNAを抽出した。

【0292】

cDNAの合成は、Random Hexamers (ロシュ) 及びImpromII逆転写酵素(Promega)を用いて行った。

【0293】

コロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子は高度に保存されていることが知られており、このウイルスファミリーの系統解析に用いられている (Stephensen et al., 1999)。コロナウイルスの検出のため、Stephensen et al. (1999)に記載されるポリメラーゼ遺伝子に対する2Bp及び4Bmプライマーの改変物を用いた (Conscoro5: 5'-ACT-CAR-ATG-AAT-TTG-AAA-TAT-GC (SEQ ID NO. 31)、及びConscoro6: 5'-TCA-CAC-TTA-GGA-TAR-TCC-CA (SEQ ID NO. 32))。

【0294】

PCRは、終濃度が2.5mMのMgCl₂と0.5μMのプライマーを含む所定の反応バッファー中でTaqポリメラーゼ(Promega)を用いて行った。Conscoro5及びConscoro6プライマーを用いたPCRでは、以下の温度制御とした。95℃5分の変性後、95℃1分、37℃1分でアニール、及び72℃1分で伸長のサイクルを10回行った。続いて、アニール温度45℃で10サイクル、アニール温度50℃で10サイクル、及びアニール温度53℃で10サイクル行い、最後の伸長を72℃で10分を行った。

【0295】

PCR産品の20μl画分を1.5%アガロースゲルで分析し、電気泳動の後ナイロンメンブレン (ロシュ) 上にブロットした。ナイロンメンブレンはPCR産品に特異的なオリゴヌクレオチドプローブと37℃で一晩ハイブリダイズさせた (Probe Conscoro: AAG-TT-TAT-GGY-GGY-TGG-GA (SEQ ID NO. 33))。ジゴキシゲニン-dUTPを伴う3'-A-末端のプローブを用い、抗ジゴキシゲニン複合体及びCSPD化学蛍光基質 (ロシュ) を用いて検出した。

【0296】

スパイク遺伝子に特異的なプライマー配列は、ウシコロナウイルスLY-138系統 (AF058942) 及びヒトコロナウイルスOC43系統のスパイク領域の配列 (L14643) 由来のものである。

【0297】

PCRはSpike1及びSpike2プライマーを用いて行い、続いてSpike3及びSpike4プライマー並びに2μlの最初の増幅産物を用いてネステッドPCRを行った。

【0298】

括弧書きの数字は、ウシコロナウイルスゲノムにおけるヌクレオチドの位置を示す。

Spike1: 5'-CTT-ATA-AGT-GCC-CCC-AAA-CTA-AAT (25291-25314)

Spike2: 5'-CCT-ACT-GTG-AGA-TCA-CAT-GTT-TG (25912-25890)

Spike3: 5'-GTT-GGC-ATA-GGT-GAG-CAC-CTG (25320-25339)

Spike4: 5'-GCA-ATG-CTG-GTT-CGG-AAG-AG (25762-25742)

10

20

30

40

50

【0299】

オリゴヌクレオチドのSpike1はSEQ ID No. 34、Spike2はSEQ ID No. 35、Spike3はSEQ ID No. 36、Spike4はSEQ ID No. 37である。

【0300】

温度制御は、95℃5分の変性後、95℃1分、55℃1分でアニール、及び72℃40秒で伸長のサイクルを35回行った。72℃10分で最後の伸長を行った。ネステッドPCRにより442bpの断片を産した。

【0301】

PCR産物はpGEM-T-easyベクター(Promega)にクローニングされ、Cy5標識プライマーを用いたThermo sequenase 蛍光標識プライマーサイクルシーケンスキット及び7-deaza-dGTP (アマシャムファルマシア) を用いてシーケンシングした。

10

【0302】

系統解析

ポリメラーゼ遺伝子由来の250bpのcDNA配列と、11のコロナウイルスの対応する配列との配列解析は、Clustal Xを用いて行った(Thompson et al., 1997)。

【0303】

公知のコロナウイルスとの系統学的な関係は、Phylip 3.6 package(Felsenstein, 1989)を用いて解析した(Felsenstein, 1989)。配列はSeqbootプログラムを用いてブートストラップ解析を行った。得られたデータはDNAParsプログラムを用いた最節約法に供し、またコンセンサスツリーはConsenseを用いて算出した。こうして得られた系統図をTreeviewプログラムを用いて描画した(Page, 1996)。

20

【0304】

ELISA

ウシコロナウイルス、イヌ腸性コロナウイルス(CECV)のELISA抗原(ウイルスに感染した細胞培養物から調製したもの。Churchill Applied Biosciences, Huntingdon, UKより購入)を推奨される濃度にてPBSに再懸濁させ、96穴プレート(ファルコン)で37℃で一晩インキュベートした。

【0305】

プレートをPBSで洗浄し、5%スキムミルクを含むPBSで30分ブロッキングした。血清はブロッキングバッファーで1:100に希釈し、プレートで1時間インキュベートした。PBS/0.05%Tween20(シグマ)で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗イヌIgGコンジュゲート(Sigma)(PBS/0.05%Tween20で1:5000希釈)を加えて1時間した。プレート発色基質(OPD、シグマ)で10分インキュベートし、2MのH₂SO₄を加えて反応を停止させた。492nmにおける吸収をELISA分光計で決定した。

30

【0306】

ウイルス培養

イヌ成犬の肺線維芽細胞(継代3から7)、MDCK及びA72細胞においてウイルスの単離を行った(ウイルスの単離は初代細胞、またはMDCKなどの細胞株、またはA72(イヌ)、MDBK(ウシ)、HRT-18(ヒト直腸性腫瘍細胞株)及びVer o(アフリカミドリザル)を用いて行われるのが好ましい)。肺線維芽細胞は20%ウシ胎児血清(FCS)を含むMEMで培養し、MDCK及びA72細胞は5%FCSを含むMEMで培養する。気管組織試料(おおよそ25mg)はメスでホモジナイズし、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(0.1mg/ml)、アンフォテリシンB(2.5µg/ml)及びトリプシン(1µg/ml)を含む1mlのMEM中で強く攪拌する。試料を13000rpmで10分間遠心分離し、上清を細胞培養物の接種に用いた。37℃30分経過後、上清を除去し、維持培地を培養物に加える。培養物を細胞変性の効果がない状態で3代継代する。次いで、RNAを細胞から抽出し、CECVの存在を検

40

50

出するための R T - P C R を行う。

【0307】

統計分析

データはカイ二乗検定またはフィッシャーの直接確率検定により分析し、p 値が 0. 05 未満であれば統計的に有意とした。

【0308】

結果

【0309】

コロナウイルス R N A ポリメラーゼ遺伝子に対するコンセンサスプライマーを用いた P C R

Conscoro5 及び Conscoro6 プライマーを用い、40 の気管試料から得た c D N A を R T - P C R により分析した。

【0310】

P C R 及びそれに続くハイブリダイゼーションにより、これらのうち 7 の試料が陽性であることが判明した (17. 5%)。

【0311】

P C R 産物をクローニング及び配列決定し (図 1 及び図 2)、配列データを F A S T A 検索プログラムを用いて利用可能なウイルスの配列と比較した (Pearson, 1990)。

【0312】

4 のイヌ気管試料から得たコロナウイルス c D N A ポリメラーゼ配列を他のコロナウイルス配列と比較した結果、それらは Quebec 及び LY138 系統の B C V の配列 (GenBank アクセス番号はそれぞれ A F 2 2 0 2 9 5 及び A F 0 5 8 9 4 2) 及びヒトコロナウイルス OC43 系統 (GenBank アクセス番号 A F 1 2 4 9 8 9) の配列と最も似ていることが明らかとなった。解析した 250 b p の配列の同一性は、B C V Quebec とは 98. 8%、B C V LY138 及び H C V p o l 遺伝子とは 98. 4% であったが、一方で C C V 1-71 系統の p o l 遺伝子とは 68. 53% にすぎなかった (図 6 及び図 7)。

【0313】

この新規な配列と 11 のコロナウイルスの対応する配列との配列比較、及び最節約法を用いた解析により得られたコンセンサスツリーを図 5 に示す。気管試料 (T 1 0 1) より得られた c D N A 配列は、ウシコロナウイルス、ヒトコロナウイルス-OC43、及び赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルスと共通する分岐に位置することがわかった。

【0314】

このウイルスをイヌ呼吸器コロナウイルス (C R C V) と呼ぶ。

【0315】

スパイク遺伝子に対するプライマーを用いた P C R

C R C V の R N A 配列を更に解析するために、ウシコロナウイルス LY138 系統 (AF058942) 及びヒトコロナウイルス OC43 系統 (L14643) との R N A の配列比較を Clustal X を用いて行った (Thompson et al., 1997)。コンセンサス領域に基づいてネステッドプライマーのセット Spike 1-2 及び Spike 3-4 の選択した (図 11)。119 の気管及び肺試料からネステッドプライマーを用いて得られた c D N A に対して P C R 分析を行った。

【0316】

ネステッド P C R により、総計で 32 の気管試料 (26. 9%) 及び 20 の肺試料 (16. 8%) が陽性であることがわかった。8 匹のイヌについては、気管及び肺の両方において P C R 結果が陽性であった。

【0317】

6 匹の異なるイヌの組織から得た P C R 産物の配列分析により、これらの c D N A からこれらが同一の D N A 配列であることが示された (図 3 及び 4)。F A S T A プログラムを用いて公知のコロナウイルスのスパイク配列と比較したところ、ウシコロナウイルスとは 98. 1% の同一性、ヒトコロナウイルス OC43 系統とは 97. 8% の同一性があることが明らかとなった (図 9 及び図 10)。

10

20

30

40

50

【0318】

HE遺伝子に対するプライマーを用いたPCR

ウシコロナウイルス及び他のグループIIのコロナウイルスは、さらに構造タンパクである血球凝集素／エステラーゼ（HE）を含有している。CRCVがBCVと高い同一性を示したことから、我々はCRCVにおけるHE遺伝子の存在について分析した。

【0319】

BCV及びOC43系統HCVのHE遺伝子配列の配列比較をHE1及びHE2プライマーの設計に用いた（表2）。S遺伝子に対するプライマーを用いたRT-PCRにより陽性と確認された4の気管試料をHE遺伝子に対するプライマーセットを用いたRT-PCRにより試験した。アガロースゲル電気泳動の結果、4の試料のすべてが予想されたサイズのPCRバンドを示した（図17）。

【表2】

表2： BCV (GenBank アクセス番号 No.M84486) 及びHCV OC43 (GenBank アクセス番号 No.M76373) の配列解析より設計したプライマー

名称	配列	BCVの HE遺伝上の位置
HE 1	5'-TAT-CGC-AGC-CTT-ACT-TTT-GT	418-437
HE 2	5'-ACC-GCC-GTC-ATG-TTA-TCA-G	914-896

【0320】

HE1プライマーはSEQ ID No. 38であり、HE2プライマーはSEQ ID No. 39である。HE1及びHE2プライマーを用いたCRCVのPCR産物の配列を図13に（SEQ ID No. 21）、その予想されるアミノ酸配列を図14（SEQ ID No. 22）に示す。これらのヌクレオチド及びアミノ酸配列と、他のコロナウイルスの対応する断片との比較を図15及び図16に示す。表3に示すように3のアミノ酸配列がCRCVに特有であった。

【表3】

表3：CRCVのHE遺伝子独自のアミノ酸

CRCVの アミノ酸	BCV/HECV/HCV/ HEVのアミノ酸	BCV/HECV/HCV/ HEVでの位置	PCR産物HE1- HE2での位置
F (Phe)	L (Leu)	235	96
N (Asn)	T (Thr)	242	103
L (Leu)	V (Val)	253	114

【0321】

BCV、HECV、HCV、及びHEVにおけるアミノ酸の位置については、BCV及びOC43系統のHCVのHEタンパク（それぞれGenBankアクセス番号M84486及びM76373）の最初のM（これを1番とする）から番号を付した。

【0322】

PCR陽性の試料と呼吸器症状の関連

スパイク遺伝子に対するプライマーを用いて、119匹のイヌから得た気管及び肺試料をCRCVに対するRT-PCRにより分析した。このうち、42匹のイヌは呼吸器症状が無く（1度）、18匹のイヌは軽症の呼吸器症状を示し（2度）、46匹は中程度の（3度）そして13匹は重症の呼吸器症状（4度及び5度）を示した。4度と5度については、本グループでは症例が少ないため併合した。

【0323】

表4は異なる程度の呼吸器疾患を持つイヌにおけるコロナウイルスに対するPCRの結果を示したものである。特に、表4はコロナウイルスのSタンパクに対するネステッドPCRを用いた、異なる呼吸器症状（無しからひどいものまで）を持つ119匹のイヌの気管及び肺試料から得られたRT-PCRの結果を試料総数に対する陽性試料の数とその割合（カッコ内）と共に示したものである。

【表4】

表4： 気管及び肺試料のRT-PCR結果

呼吸器の症状	気管 陽性試料	肺 陽性試料	気管及び肺 陽性試料
無し	11/42 (26.2%)	8/42 (19.1%)	2/42
軽症	10/18 (55.6%)	4/18 (22.2%)	4/18
通常	9/46 (19.6%)	8/46 (17.4%)	2/46
重症	2/13 (15.4%)	0/13	0/13

【0324】

CRCVの血清によるアッセイ法の確立

CRCVのスパイクcDNAとウシコロナウイルスのスパイク領域との相同性から、BCVに対するELISA抗原をCRCVの血清による分析に用いた。

【0325】

調査した犬舎にて飼育されたことが無く、伝染性の呼吸器疾患に罹患した経歴のない5匹のイヌの血清を試験した。OD値は-0.013から0.39であり、平均値は0.154であった。また、様々な理由から動物病院に来院した30匹のイヌの血清について、コロナウイルスの抗体に対する試験を行った。そのうち、20の試料は<0.4（-0.46から0.396）のOD値を示し、10の試料は>1.0のOD値（1.012から1.949）を示した。OD値が0.6以上の試料は、実質上陽性と考えられる。

【0326】

呼吸器疾患を持つ及び持たないイヌのCRCVに対する免疫応答の比較

調査した犬舎の111匹のイヌの血清の組について、BCV抗原ELISAを行った。このうち、81匹のイヌは21日間期間中に呼吸器疾患の症状を示しており、30匹は健康であった。

【0327】

呼吸器疾患のイヌのグループについて、犬舎に来院した日において17匹はCRCVに対す

る抗体が陽性であり、64匹は陰性であった。

【0328】

1日目にBCVに対する抗体が検出されなかった64匹のイヌについて、21日目には63匹が陽性であった。63匹中7日目の試料が利用可能な46匹のすべてにおいて、7日目の結果は陰性であった。従って、63匹のイヌが試験期間中に血清変換を起こし、陰性のままだったのはたった1匹だった。

【0329】

健康なままだった31匹のイヌの内、17匹のイヌは犬舎に来た日においてCRCVに対する抗体を持っていた。1日目に陰性だった13匹のイヌは、7日目においてもすべて陰性であったが、21日目までに血清変換を起こした。

10

【0330】

従って、犬舎に到着した日にCRCVに対する抗体が陽性だった34のイヌのうち、17匹が呼吸器疾患に罹患したが(50%)、一方で到着時に陰性だった77のイヌは試験期間中に64匹(83.1%)が呼吸器疾患の症状を示した(図12)。

【0331】

従って、犬舎に来た日にCRCVに対する抗体を持たないイヌは呼吸器疾患に罹患する可能性が高かった($p < 0.001$)。

【0332】

犬舎に来た日に陰性だった77匹のイヌのうちたった1匹が21日の試験期間において陰性のままであり、76匹は血清転換を起こした。

20

【0333】

イヌ腸性コロナウイルス(CECV)抗原を用いた血清学

CRCVがイヌ腸性コロナウイルスと血清学的な交差反応を起こすかどうかを調べるために、イヌコロナウイルス抗原を用いたELISAアッセイを行った。BCV抗原を用いてCRCVに対する抗体の試験を行った27匹のイヌの血清を選出した。

【0334】

そして、8匹のイヌが犬舎に来た日にCECVに対する抗体を持っており、そのうちの4匹はCRCVに対する抗体も持っていた。19匹のイヌは1日目にはCECVに対して陰性であり、そのうち17匹はCRCVに対しても陰性であった。この19匹のイヌのうち、5匹は21日の試験期間中にCECVに対する血清変換を起こし、17匹はCRCVに対する血清変換を起こした。

30

【0335】

このグループにおける呼吸器疾患の罹患率を分析した結果、1日目にCECVに対する抗体が陽性であった8匹のうち6匹(75%)が呼吸器疾患に罹患した。1日目にCECVに対する抗体が検出されなかった19匹のイヌのグループについては、15匹が呼吸器疾患の症状を示した(78.9%)($p = 0.594$)。

【0336】

ウイルスの単離

RT-PCRによりCRCVのRNAが陽性と確認されたイヌの気管組織試料を、イヌ成熟線維芽細胞及びMDCK細胞の培養細胞に植え付ける。いくつかの試料については、A72細胞においてウイルスの単離も行う。培養物は3世代の継代において細胞病理学的な徴候を示さない。数回の継代後、培養組織からRNAを抽出し、RT-PCRによりCRCVのRNAの有無を試験した。

40

【0337】

考察

【0338】

本研究は、犬舎に飼育される呼吸器疾患を持つイヌにおける新規なコロナウイルスであるCRCVについて報告するものである。

【0339】

コロナウイルスはヒト、ネコ、ブタ、家禽類の呼吸器疾患を引き起こすことが報告され

50

ているが、イヌの気管における存在及びイヌの伝染性呼吸器疾患（C I R D）との関係は確認されていなかった。

【0340】

C I R Dが流行しており、C I R Dに対して推奨されるワクチンの使用によっても流行を抑制することができなかった犬舎のイヌについて調査した。これらのイヌの気管から採取した試料を、コロナウイルスの保存ポリメラーゼ遺伝子に対するR T - P C Rプライマーを用いて試験した(Stephensen et al., 1999)。

【0341】

まず、7の気管試料が陽性であることがわかった。R T - P C R産物の配列を決定し、すべての利用可能なコロナウイルスポリメラーゼ遺伝子の配列と比較した。この解析により、イヌ試料から得たc D N A配列が、ウシコロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子（98.8%）及びヒトコロナウイルスのOC43系統（98.4%）と最も高い同一性を持つが、腸性イヌコロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子とは低い同一性しか持たない（1-71系統、68.53%）ことが明らかとなった。

【0342】

11のコロナウイルスのポリメラーゼ配列を用いて、系統学的な解析を行った。イヌの気管から検出したコロナウイルス（C R C V）は、第2グループに属する3のウイルス（B C V、OC43系統のH C V、及びH E V）と同じ分岐に位置していた。しかしながら、グループ1のコロナウイルスである、イヌ腸性コロナウイルスは、遠く関係しているにすぎなかった。

【0343】

従って、イヌ呼吸器コロナウイルスは新規なイヌのウイルスであり、共に呼吸器疾患の原因となることで知られるB C V及びH C V - OC43と密接に関係するウイルスである。

【0344】

より多くの配列情報を得るため、またより変化しやすい遺伝子を用いて他のコロナウイルスとの関係を決定するために、スパイク遺伝子の一部を解析した。C R C VはB C V及びH C V - OC43と最も類似していることが示されたことから、これらのスパイク遺伝子の配列をネステッドプライマーのセットを設計するのに用いた。より感度の良いアッセイが達成されるように、ネステッドプライマーが選択された。

【0345】

このR T - P C Rの産物のシーケンスにより、C R C VがB C V及びH C V - OC43と高い同一性を持つことが確認された。

【0346】

B C VとC R C Vのスパイクc D N Aは高い同一性を持つことから、B C V抗原に基づくE L I S Aを用いてC R C Vに対する抗体の有無を分析した。E L I S Aの結果により、調査個体群におけるB C Vに類似するウイルスの存在が確認された。

【0347】

犬舎に来た時は30%だった抗体の保有率は、21日後には99%となった。

【0348】

興味深いことに、また予期しなかったことに、血清の分析から犬舎に来た日にC R C Vに対する抗体を持っていたイヌは抗体を持たなかったイヌに比べて呼吸器疾患に罹患する確率が低かった（ $p < 0.001$ ）。従って、今回の個体群C R C Vに対する抗体の存在によって、において呼吸器疾患に対する防護的な効果があった。

【0349】

犬舎に来た日に陰性だったイヌのほとんどが3週間の間にC R C Vに対する血清変換を起こしたことから、このウイルスが非常に伝染性であることが示唆される。イヌ腸性コロナウイルス（C E C V）に対する抗原の血清としての使用により、21日目におけるC E C Vに対する抗体の保有率はがずっと低いことが示された。従って、B C V - E L I S Aの結果はイヌ腸性コロナウイルスへの感染を反映しておらず、これら2種の抗原間での交

10

20

30

40

50

差反応は低いことが示された。

【0350】

CRCVに対する血清抗体は、飼い犬や救助施設にきたイヌなどを含む様々なイヌのうちの30%に見られた。従って、CRCVの存在は調査した犬舎に限ったものではなく、ウイルスはイヌ全体に定着しているようである。

【0351】

PCRによって、気管組織及び肺組織に検出されたことから、CRCVは上気道及び下気道に感染しているようであった。犬舎の個体群において、CRCV-RNAはあらゆる程度の呼吸器疾患を持つイヌの27.3%で検出され、安楽死の時点では一見すると健康であるイヌの26.2%で検出された。

10

【0352】

CRCV-RNAは軽症の咳をするイヌの気管から最も高い割合で発見された(55%)。229-E系統のヒトコロナウイルスを用いた研究により、コロナウイルスは気管上皮の破壊及び繊毛の運動異常を引き起こすことが知られている(Chilvers et al., 2001)。理論に束縛されないのであれば、CRCVの感染は同様な効果を持ち、ウイルスはCIRDの病因のうちの初期段階において重要な役割を持つことを我々は確信している。CRCVが気管上皮を傷つけ、繊毛の運動を妨げることで、他のウイルスや病原菌の侵入が容易になる。したがって、CRCVの感染自体は軽症の呼吸器症状しか引き起こさないが、他の病原体と共同して重症な呼吸器疾患を引き起こすのであろう。

【0353】

Bordetella bronchiseptica、イヌアデノウイルス2型及びイヌパラインフルエンザがCIRDの主要な原因であると決定されたため、1970年代以降CIRDの病因については詳細に調査されていなかった。しかしながら、すべてのイヌにCPIV、CAV-2及びジステンパーウイルスに対する予防接種を行い、大多数のイヌが21日以内にワクチンに应答したことが示されたにもかかわらず、この予防接種は今回の犬舎における病気の抑制を手助けするものとはならなかった(データ示さず)。

20

【0354】

この研究より、CIRDには新規なイヌ呼吸器コロナウイルスが関係していることが示された。従って、CIRDの病因を再評価し、新規な微生物や以前はこの病気に関係しないとされた微生物の役割を立証しなければならないであろう。

30

【0355】

参考文献

【0356】

Appel, M., and Binn L.N. (1987) Canine infectious tracheobronchitis, Short review: kennel cough. In "Virus infections of carnivores" (M. Appel Ed.), 1st Edition, pp201-211 Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

Bemis, D.A., Carmichael, L.E., and Appel, M.J. (1977). Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.* 67, 282-93.

Binn, L.N., Alford, J. P., Marchwicki, R. H., Keefe, T.J., Beattie, R. J., and Wall, H.G. (1979). Studies of respiratory disease in random-source laboratory dogs: viral infections in unconditioned dogs. *Lab Anim Sci.* 29, 48-52

40

Binn, L. N., Eddy, G. A., Lazar, E. C., Helms, J., and Murnane, T. (1967). Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 126, 140-5

Chilvers, M. A., McKean, M., Rutman, A., Myint, B. S., Silverman, M., and O'Callaghan, C. (2001). The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J.* 18, 965-70.

【0357】

Ditchfield, J., Macpherson, L. W., and Zbitnew, A. (1962). Association of a ca

50

nine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("kennel cough"). Can. Vet. Jour. 3, 238-247

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2c). *Cladistics* 5, 164-166

Ignjatovic, J., and Sapats, S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech.* 19, 493-508.

Karpas, A., King, N.W., Garcia, F.G., Calvo, F., and Cross, R.E. (1968). Canine tracheobronchitis: Isolation and characterization of the agent with experimental reproduction of the disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 127, 45-52.

Keil, D.J., and Fenwick, B. (1998). Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 15, 200-7.

Lou, T.Y., and Wenner, H.A. (1963). Natural and experimental infection of dogs with reovirus, type 1: pathogenicity of the strain for other animals. *Am.J.Hyg.* 77, 293-304.

Makela, M.J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Leinonen, M., Saikku, P., Kimpimäki, M., Blomqvist, S., Hyypia, T., Arstila, P. (1998). Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 36, 539-42.

Page, R.D.M. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358

Pearson WR. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 1990;183:63-98.

Pensaert M, Callebaut P, Vergote J. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Q.* 1986 Jul;8(3):257-61.

Randolph JF, Moise NS, Scarlett JM, Shin SJ, Blue JT, Bookbinder PR. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 1993 Mar;54(3):387-91.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol.* 1988 Dec;69 (Pt 12):2939-52.

Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.* 1999 Apr;60(2):181-9.

Storz J, Purdy CW, Lin X, Burrell M, Truax RE, Briggs RE, Frank GH, Loan RW. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotidal viruses, and *Pasteurella* spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J Am Vet Med Assoc.* 2000 May 15;216(10):1599-604.

Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet Rec.* 1993 Jan 2;132(1):7-11.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15;25(24):4876-82.

【実施例 2】

【0358】

CRCVスパイクのクローニング及び発現

CRCVのスパイク遺伝子は表5に示すプライマー及び以下のクローニング法を用いてクローニングした。これらは図18に図示される。

【0359】

1. スパイク遺伝子を4の重複断片で増幅した。

2. PCR産物であるSp5-Sp2(B)は重複部分におけるPvuIIサイトを用いてSp1-Sp8(C)に結合させた。

3. この断片を制限サイトNcoI及びBstXIを用いてpT7blue2ベクター (Novagen) にクローニングした。

4. PCR断片SpFXho-Sp6(A)を、重複部分のBstXI及びSpF-Xhoプライマーに取り込ませたXhoIサイトを用いてBCに結合させた。

5. 断片ABCを制限サイトXhoI及びNcoIを用いてバキュロウイルス輸送ベクターpMelBac B (Invitrogen)に移送した。

6. PCR断片Sp7-SpR-HisTag-Eco(D)を、重複部分のNcoI及びプライマーSpR-Eco-His Tagに取り込まれたEcoRIの制限サイトを用いてABCに結合させ、pMelBacB中の完全なスパイク遺伝子(Spike MelBac)を得た。これには、発現タンパクのC末端にHisTag (6xHis)が含まれる。

7. 哺乳類における発現のため、完全遺伝子をpMelBacBのBamHIサイト及びABCDの末端のEcoRIサイトを用いてpSecTagA (Invitrogen)に移送してプラスミドSpikeSecTagとした。

【0360】

組み換えバキュロウイルスの構築

Bac-N-BlueバキュロウイルスDNA (Invitrogen)及びSpike MelBacを用いてSf9細胞に同時導入を行った。得られたバキュロウイルス (AcSpCRCV 1-11) には、組み換え部位の上流及び下流に位置するプライマー (Invitrogen) を用いたPCRにより、全長が挿入されていることが示された。

【0361】

哺乳動物細胞における発現

Spike SecTagプラスミドは、リポフェクタミン (Invitrogen) を用いてBHK-21細胞に導入した。ELISA (Churchillより得たBCV抗原) によってCRCVに対する抗体が陽性であることが示されたイヌの血清試料及びChurchillより得たBCVに対するポジティブコントロール血清 (トリ抗BCV) を用いて、スパイクタンパクの発現を分析した。導入が行われた細胞はイヌまたはトリ血清及びFITC標識複合体 (FITC抗イヌIgGまたはFITC抗トリIgG) を用いた免疫蛍光アッセイにおいてポジティブな標識を示す。

10

20

30

【表 5】

表5: ウシコロナウイルス (GenBank アクセス番号 No. AF058942) 及びヒトコロナウイルス OC43 (GenBank アクセス番号 No. L14643) のスパイク遺伝子の配列比較より設計されたプライマー

名称	配列	SEQ ID NO:	BCVスパイク遺伝子 における位置
Sp 1	5'-CTT-ATA-AGT-GCC-CCC-AAA-CTA-AAT	40	1637-1660
Sp 2	5'-CCT-ACT-GTG-AGA-TCA-CAT-GTT-TG	41	2258-2236
Sp 3	5'-GTT-GGC-ATA-GGT-GAG-CAC-TG	42	1666-1686
Sp 4	5'-GCA-ATG-CTG-GTT-CGG-AAAG-AG	43	2107-2088
Sp 5	5'-AAC-GGT-TAC-ACT-GTT-CAG-CC	44	931-950
Sp 6	5'-CAA-GTA-AAT-GAG-TCT-GCC-TG	45	1121-1102
Sp 7	5'-GGC-TGC-CAC-CTC-TGC-TAG-TC	46	2919-2938
Sp 8	5'-ATT-GTT-AAA-TGC-ATT-AGC-AAT-AAG-C	47	3069-3045
SpF	5'-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	48	4-29
SpR	5'-GTC-GTC-ATG-TGA-WGT-TTT-RAT-TAC	49	4089-4066
SpF-XhoI	5'-AGC-TCG-AGC-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	50	
SpR His- EcoRI	5'-TTG-AAT-TCT-TAA-TGA-TGA-TGA-TGA-TGA-TGG-TCG-TCA-TGT-GAW-GTT-TTR-ATT-AC	51	

SpF-XhoI は Xho I サイト (太字) を含む。SpR-His-EcoR I は 6xHisTag (二重下線)、終止コドン (下線)、及び EcoR I サイトを含む。

【図1】CRCVポリメラーゼ (pol) cDNAの部分ヌクレオチド配列 (250残基) (SEQ ID No. 1)。

【図2】図1の塩基配列由来のCRCVのpolタンパクの部分アミノ酸配列 (83残基) (SEQ ID No. 2)。

【図3】CRCVのスパイク (S) cDNAの塩基配列 (4092残基) (SEQ ID No. 3) 3531番目のYはCもしくはTの何れかである。

【図4】図3の塩基配列由来のCRCVのSタンパクのアミノ酸配列 (1363残基) (SEQ ID No. 4)。

【図5】12種のコロナウイルスにおけるポリメラーゼ遺伝子の250塩基領域についてのcDNA配列のコンセンサスツリー。イヌ呼吸器コロナウイルスから得られた配列をT101で示す。数字は100種のデータセットを解析して得られたブートストラップ値を示す。BCV：ウシコロナウイルス、CCV：イヌコロナウイルス、FIPV：ネコ伝染性腹膜炎ウイルス、HEV：ブタ赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス、IBV：伝染性気管支炎ウイルス、MHV：マウス肝炎ウイルス、OC43：ヒトコロナウイルスOC43系統、SDAV：シアロ腺炎ウイルス、TCV：七面鳥コロナウイルス、TGEV：伝染性胃腸性炎ウイルス、229E：ヒトコロナウイルス、229E系統、T101：イヌ呼吸器コロナウイルス (気管試料T101のPCR産物)。

10

【図6】CRCV (サンプルT101 SEQ ID No. 1)、BCV (SEQ ID No. 5)、HCVのOC43系統 (SEQ ID No. 6)、HEV (SEQ ID No. 7) およびCCV (腸性CCV SEQ ID No. 8) のpolのcDNAの250塩基部分配列におけるCLUSTAL X (1.8) 多重配列解析。

20

【図7】CRCV (protCRCVpol (SEQ ID No. 2) のpolタンパクと、HCV (protHCVpoly、SEQ ID No. 9)、HEV (protHEVpolyにSEQ ID No. 10)、BCV (protBCVpolyにSEQ ID No. 11) およびCECV (腸性CCV、protCECVpol、SEQ ID No. 12) のpolタンパクとにおける83塩基部分配列のCLUSTAL X (1.8) 多重配列解析。

【図8】CRCVスパイクcDNA (CRCVspike、SEQ ID No. 3) と腸性CCVスパイクcDNA (CECVspike、SEQ ID No. 13) の塩基配列におけるCLUSTAL X (1.8) 多重配列解析。

30

【図9】CRCVのスパイクcDNA (CRCVspike、SEQ ID No. 3) 配列と、BCV (BCVspike、SEQ ID No. 14)、HCV (HCVspike、SEQ ID No. 15) 及びHEV (HEVspike、SEQ ID No. 16) スパイクcDNA配列とにおける4092塩基のCLUSTAL X (1.8) 多重配列解析CRCVの3531番目のYは、CまたはTのいずれかである。

【図10】CRCVのスパイクタンパク (CRCVspikepr、SEQ ID No. 4) とBCV (BCVspikepro、SEQ ID No. 17)、HCV (HCVspikepro、SEQ ID No. 18)、HEV (HEVspikepro、SEQ ID No. 19) 及び腸性CCV (CECVspikepr、SEQ ID No. 20) のスパイクタンパクとにおける1363アミノ酸のCLUSTAL X (1.8) 多重配列解析。

40

【図11】入れ子状態の組となったプライマー (Spike1及び2 (SEQ ID Nos. 34及び35) とそれに続くSpike3及び4 (SEQ ID Nos. 36及び37)) を使ったRT-PCR。BCV：ウシコロナウイルスのポジティブコントロール試料、A72：コロナウイルスに感染していないA72細胞；H₂O：DNAを含まないPCR混合物；T5-T21：研究対称の犬の気管試料。アガロースゲル電気泳動により、ポジティブコントロール並びに試料T12及びT21のPCR産物の推定サイズは442bpであることが示された。

【図12】2のイヌのグループにおける呼吸器疾患の罹患率の比較。グループ1のイヌは犬舎に入る日において呼吸器コロナウイルスに対して血清抗体が陽性であり、グループ2

50

は陰性であった。グラフはグループ2と比較したグループ1においてイヌが呼吸器疾患を発症した割合を示すものである。nは、各グループのイヌの総数である。

【図13】CRCV血球凝集素／エステラーゼ（HE）遺伝子の部分ヌクレオチド配列（497残基）（SEQ ID No. 21）。配列はBCVのHE遺伝子（Genbank M84486）とHCV OC43（Genbankアクセス番号M76373）のヌクレオチド418から914に対応する。

【図14】図13のヌクレオチド配列由来のCRCVのHEタンパク（SEQ ID No. 22）の部分アミノ酸配列（165残基）。配列はBCVのHE遺伝子（Genbank M84486）とHCV OC43（Genbankアクセス番号M76373）のヌクレオチド140から304に対応する。

10

【図15】CRCV（イヌ呼吸器コロナウイルス、SEQ ID No. 21）の血球凝集素／エステラーゼ（HE）遺伝子と、BCV（ウシコロナウイルスLY138系統、（SEQ ID No. 23、Genbankアクセス番号AF058942より取得）、OC43（ヒトコロナウイルスOC43系統、SEQ ID No. 24、Genbankアクセス番号M76373より取得）、HECV（ヒト腸性コロナウイルス、SEQ ID No. 25、Genbankアクセス番号L07747より取得）、及びHEV（赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス、SEQ ID No. 26、Genbankアクセス番号AF481863より取得）の血球凝集素／エステラーゼ（HE）遺伝子との497ヌクレオチド部分配列のCLUSTAL X（1.8）多重配列解析

【図16】CRCV（イヌ呼吸器コロナウイルス、SEQ ID No. 22）のHEタンパクと、BCV（ウシコロナウイルスLY138系統、SEQ ID No. 27、Genbankアクセス番号AF058942より取得）、OC43（ヒトコロナウイルスOC43系統、SEQ ID No. 28、Genbankアクセス番号M76373より取得）、HECV（ヒト腸性コロナウイルス、SEQ ID No. 29、Genbankアクセス番号L07747より取得）、及びHEV（赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス、SEQ ID No. 30、Genbankアクセス番号AF481863より取得）のHEタンパクとの165アミノ酸部分配列のCLUSTAL X（1.8）多重配列解析 CRCV特異的な3のアミノ酸であるF、N、及びLを太字及び下線で示す。

20

【図17】BCV及びHCV（OC43系統）のHE遺伝子を対称とするコンセンサスプライマーHE1（SEQ ID No. 38）及びHE2（SEQ ID No. 39）を用いたRT-PCRアガロースゲル電気泳動により推測されるPCR産物のサイズはBCVポジティブコントロール及び研究対象のイヌのうちの4つの気管試料（T90、T91、T101及びT105）については497bp示したが、コロナウイルス陰性のA72細胞またはDNAを含まないPCR混合物（H₂O）は示さなかった。1kbとは分子サイズ標準を示す（プロメガ）。

30

【図18】CRCVスパイクタンパクのクローニングの方策。

【図 1】

FIGURE 1

```

ctcagatgaa ttgasaatat gctattagtg ctaagaatag agcccgact gttgctgggtg 60
ttccatact tagtactatg actggcgaa tggttcatca aaaaagtgtg aaagtatatg 120
cagctacacg tgggttctct gttgttatag gcaccactaa attttatggc ggctgggaag 180
atatgttacg tgccttattt aaagatgttg acaatcctgt acttatgggtg tgggattatc 240
ctaagtgtga 250

```

【図 2】

FIGURE 2

```

QMDLKYAISA KNRARTVAGV SILSTMGRM FHQKCLKISA ATRGVFVVIG TTFYGGWDD 60
MLRLRLKIDVE NPFVLMGMDYP KCE 84

```

【図 3】

FIGURE 3 (Page 1 of 2)

```

atgtttttga taactttaat ttccattacca atggcttttg ctgttatag agatttaaa 60
tgtactacgg ttccatcaaa tgaatgtgac acoggtgctc ctctattag cactgatgtt 120
gtcgatgta ctaagtgttt aggtactatt tatgttttag atogtgtgta tttaataact 180
acattgttgc ttaagtgtta ttactactac tcaggttcta catatogtaa tatgcaacg 240
aagggaactt tactatttag cacactatgg tttaaacac catttcttct tgaatttact 300
gatgggtgtt ttgctaaggt aaaaaatccc aaggttatta aagatgggtg agtgtatagt 360
gagtttctcg ctataactat aggtatgact ttgttaata catctatag ttggttagta 420
caaccaata ctactaattt agataataaa ttacaaggtc tottagagat ctctgtttgc 480
cagttacta ttgtcgatta ccccatatcg atgtgtcact ctaactggg taataaacgc 540
atagaactat ggcattggga tacagggtgt gtccctgttt tatataaagc taatttcaca 600
tatgatgtga atgctgatta ttgtattccc catttttacc aagaagtgtg taacttttat 660
gcataattta cagacacatg ttgttact aagtttctgt tcatgttta tttaggcacg 720
gtgctttcac attattatgt catgcccgtg actgttaata gtgctatgac tttagaatac 780
tgggtttcac ctctcaactt taacaatat ttactcgtct tcaatcaaga tgggtttact 840
tttaagtctg ttgattgtaa gagtgaattt atgagtga taaagttaa aacactatct 900
atagccact ctactgggtt ttatgaata aacggttaac ctgttcacgc aattgcagat 960
gtttacccag gtataactaa tctcccgat tgtaatatag agccttgct taatgatag 1020
tcggtgctct ctocattaaa ttgggaacgt aagacctttt caaattgtaa tttaatatg 1080
agcagctga ttgttttat cagagctgac tctgttactt gtaataatat tgatgtgct 1140
aagatatacg gtatgtttt tttagcata actatagata agtttctat accaatggt 1200
aggaaggttg aactacaact gggaacttg gctatttgc agtcttttaa ctatagaact 1260
gataactatg ctacaagtg tcagttgtat tataatttacc ctgtagtaa tgtttctatt 1320
agcaggttta atccttctat ttggaatag agatttgggt ttacagacaa atctgtttt 1380
aagctcaac ctgtaggtgt tttaactgat catgatgttg ttatgcaca acattgtttt 1440
aagctccca caaatttctg tccgtgtaaa ttgaatgggt ctgtgtgt agtagtgtt 1500
tttgtatag atgctgttta taaaatagt ggtatggga ctgttctcg agtactaat 1560
tatttaactt gttataatgc taaccaatgt gatgtttgt gcaatccaga cctatttta 1620
tctaaacta caggccctta taagtcccc caaactaat acttagttg cataggtgag 1680
cactgtctg ctgttctat taaaagtgt tatgttggt gcaatcctg taactgccaa 1740
ccaaaagcat ttttggttg ctctgtgac tctgtttac aagggtatg gtgtaatat 1800
tttgttaatt ttattttga tgggttaaat agtgtacta ctgttctac tgaatttaca 1860
aactaasaca cagacataat tctgtgtgt ttgttaaat atgacttta tggatttaca 1920
ggccaaagta ttttttga ggttaatgc actattata atagtggca gaaccttta 1980
tatgatcta atgttaact ctatgtttt aggsactac taacaaacag aactttatg 2040
atctagttg gctatagcgg tctgtttca ggggcttcc actcaactc ttccgaacca 2100
gactgtcat ttoggaatat taactgaat tacttttta ataactctc ttccagacag 2160
ctgcaacta ttaactatt tgaatgatt ctgtgttg ttgtcaatgc tgataatgt 2220

```

FIGURE 3 (Page 2 of 2)

```

actctagtt ctgtcaaac atgtgatct acagtagtta gtgttactg ggggattac 2280
tctacacaaa gacgaagtc tagaagcatt accactggt atcggtttac taattttgag 2340
ccatttactg ttaatccagt aaatgatac ttacacccg taggtgggtt gtagaactt 2400
caaatactt cagagtttac tatagtaac atggagaggt ttattcaaac aagatctct 2460
aaagttaact ttgattgtcc tgtttttgct gtgtgtgatt atgcagatg taaatcacg 2520
ttggttgaat atgttagttt ttgtgacat attaatgcta tactacacga agtaaatgaa 2580
ctacttgaca ctacacagtt gcaagtatgt aatagtttaa tgaatgggtg cactcttagc 2640
actaagetta aagatggctt taattcaat gtatagata tcaatttttc cctgtatta 2700
ggttgttagg gaagcgastg taataaagt tccagtatgt ctgatataga ggaattactt 2760
ttttcaasg taaagtatc tgaatgtgt ttgttgtatg cttataasaa ttgtactgga 2820
ggtgcogaaa ttagggaact catttgtctg caaagtata atggtatcaa agtgttgcct 2880
ccactgtct ctacaaaatca gatcagtgga tcaacttttg ctgcaactt tctagtctg 2940
ttctctctt ggtcagcagc agcagcgcta ccattttatt taaagtgtca gtatctgatt 3000
aatgttatgt gtgttaccat ggaatgtgta actcaaatc aaaaacttat ttctaatgca 3060
tttaacatg cactgtatgc tattcagga gggtttgtat ctacaaact tgcatttagt 3120
aaatkaag ctgtgtttaa tgcgaatgt gaagctotta ataacttat gcaacaactc 3180
tctaataaat ttggtgctat aagtgtctt ttacagaaga tctactatg acttgatgct 3240
cttgaagcgc aagctcagat agacagactt atcaatgggc gtcttaccg tcttaatgct 3300
tatgtttctc aacagcttag tgattctaca ctatgtaaat ttgtgcagc acaagctatg 3360
gagaaggtta atgaatgtgt caaaagccaa tcatctagga taaatttttg tggtaatgt 3420
aatcatatta tatcattagt cagaatgct ccatatggtt tgtattttat ccactttagc 3480
tatgtcccta ctaagtatgt cactgcgaag gttatgccc gtctgtgcat ygcaggtgat 3540
agaggtatag ctccataag ttgttatatt gttaatgtaa ataacactg gatgttcaat 3600
gttagtgtt attactaacc tgaactata actggaata atgtgttgt tatgatacc 3660
tgtgtgtta actatactaa agcaccggtg tgaatgctga acatttcaac acccaactc 3720
cctgatttta aggaagagtt ggaatcaatg tttaaaaaa aacattaat ggcacagat 3780
ttgtcacttg attatataa tgttactatc ttggacctac aagatgaat gaataggtta 3840
caggagccaa taaaagtitt aatcatagc tatcatcaat ccaaggaact tggatcatat 3900
gaatattatg taaaatggcc ttggtatgta tggcttttaa ttggccttg tggcgtgact 3960
atgctgttt tactattct catatgctg ttgacaggat gtggactag ttgttttaag 4020
aaatcggtg gtgtgttga tgaattactt ggaatcagg agttagtaac caaaagctca 4080
catgagact aa 4092

```

【図 4】

FIGURE 4

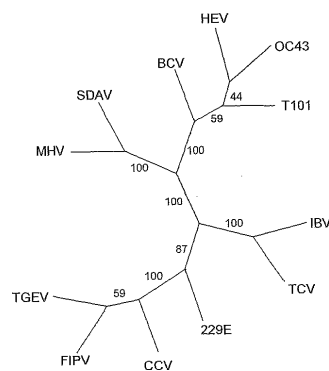
```

MELILLISLP MAFVIGDLK CTVSINDVD TGAPSISDW VDVNGLQTY YLDRVLYNT 60
TLLINGYPT SGSTYRNAL KGTLLSTLW FKFFLSDFI DGEFAKVNK KYIKDGVYS 120
EPBAITIGT FVNTSYSVV QHTNLNWK LQGLLEISVC QTHCDZPHM MCHPNLQNR 180
TELWHDGV VCLYKRNFT YDNNADLYS HFYEGGTFY AFYTDZVMT KELFVILGT 240
VLSHYYMPL TCNSMILEY WYFLTKQY LLAPHQDGI FNAVDCKSF MSHKCKTSL 300
IAPSTGYEL NGTVQPLAD VYRIRPLED CHLAKMLDR SVPSPLNWR KFSNCKNM 360
SSIMSLQAD SETCNMIDA KLYMGFFSI TDKVATPBG RKVDLMQRL CYLQSPNYRI 420
DTTATSCQLY YNLPSHWGI SFNPSIWNH RFGTTEQSVF KQPVGVFDD HDVVYQRCF 480
KAPTNCPCPK LAGSLCVSG FGIDAGKNS EIGTCFAGN YLCTYANAGC DCLCTPDRIL 540
SKSTGYKCP QTKYLVEGE HCSGLIKSD YCGNPFCTQ PKRPLGWSVD SCLQSDRNI 600
FANFLMGVN SGTCTSDQL KSNIDILGV CVNYDLYGT GQGLFVEVNA TYNSRQNL 660
YDSNGLYGF RYLLNRTFM IRSCYSGRVS AGFHSNSSEF ALLFRNKN YFVNYLSRQ 720
LQPNYFDSY LGCVWNADS TSSSVQCDL TVGSGYWDY STQRRSRRI YTVNYRNF 780
PFTVNPVND LHFVGLYEI QIPSEFTGN MEFFIQRSE KVIIDCPVEV GDYAAKCSQ 840
LVEYSGFDN INALTEVNE LLDITQLQVA NSLHNGVTL TLKIDCFN VDDINFSVL 900
CGLSECHNV SRSRSEDLL FSKVLSVGV FVDYNNCTG GAERDLICV QSYNGIKVLP 960
PLSECHQIS YTLATFASL FPKWSAAGV PFYLVQYRI NGIGVMDVL TQMKLISNA 1020
FNALDAIGE GFATNSALV KQAVVNMA EALNNLLQJ SKNPGASIS LQELISLDA 1080
LEAQAGTORL INGRALNA VYQSQSDST LVKFSRAQM EKRVKCVKSQ SSRNFCNG 1140
NHILSLQNA PIGLFIHFS YVFTKYTKA VSRGLCAGD RGIAPKSGVF VVNNVTMET 1200
GSGYIPFBI TGNVNVMSY CAVNYKAPD VKMNSTPN PPFKSELDQV ENQNYLAPD 1260
LSLDYIMVF LQIQSNRNL QBAIKVLNS YNLADIGT EYFVKPFWV WLLIGLAGVA 1320
MLVLLFIQC CTCGTSCKF KCGGCCDYT GHQELVITS HDO 1363

```

【図 5】

FIGURE 5



【図 6】

FIGURE 6

T101 CTCAGATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTTGCTGGTG
BCV CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTTGCTGGTG
OC43 CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTTGCTGGTG
HEV CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTTGCTGGTG
CCV CTCAGATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTTGCTGGTG

T101 TTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAGAATATAG
BCV TTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAGAATATAG
OC43 TTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAGAATATAG
HEV TTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAGAATATAG
CCV TTCCATACTTAGTACTATGACTGGCAGAAATGTTTCATCAAAAATGTTTGAAGAATATAG

T101 CAGCTACACGTGGTGTTCTCTGTTGTTATAGGCCACCTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG
BCV CAGCTACACGTGGTGTTCTCTGTTGTTATAGGCCACCTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG
OC43 CAGCTACACGTGGTGTTCTCTGTTGTTATAGGCCACCTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG
HEV CAGCTACACGTGGTGTTCTCTGTTGTTATAGGCCACCTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG
CCV CAGCTACACGTGGTGTTCTCTGTTGTTATAGGCCACCTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG

T101 ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAAATCTCTACTTATGGGTTGGGATATC
BCV ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAAATCTCTACTTATGGGTTGGGATATC
OC43 ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAAATCTCTACTTATGGGTTGGGATATC
HEV ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAAATCTCTACTTATGGGTTGGGATATC
CCV ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAAATCTCTACTTATGGGTTGGGATATC

T101 CTAAGTGTGA
BCV CTAAGTGTGA
OC43 CTAAGTGTGA
HEV CTAAGTGTGA
CCV CTAAGTGTGA

【図 7】

FIGURE 7

protHCvpoly ---MNLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTRGMFHOKCLKLSIAATR
protHEvpoly ---MNLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTRGMFHOKCLKLSIAATR
protBCvpoly ---MNLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTRGMFHOKCLKLSIAATR
protCRCvpoly ---MNLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTRGMFHOKCLKLSIAATR
protCEvpoly MTKMNLKYAISGKARARTVGVVSLSTMTRGMFHOKCLKLSIAATR

protHCvpoly GVPVVIGTTKFGVGGDDMLRLIKDNDVFLMGWDYPKC
protHEvpoly GVPVVIGTTKFGVGGDDMLRLIKDNDVFLMGWDYPKC
protBCvpoly GVPVVIGTTKFGVGGDDMLRLIKDNDVFLMGWDYPKC
protCRCvpoly GVPVVIGTTKFGVGGDDMLRLIKDNDVFLMGWDYPKC
protCEvpoly NATVVIGTTKFGVGGDDMLRLIKDNDVFLMGWDYPKC

FIGURE 8 (Page 2 of 9)

CRCVspike -TGTGGATTACCCACATA-CGATGTGTC-ATCCATCTGGGT-AATAACG--CATAG
CECVspike ATTTATGGCTCTGAGTGGATGAAGAAATTTGTTACAGCGTACATAGTGGTCTTCTAT

CRCVspike AACTATGGCATTTGGGATACAGGTGTTGTTCCCTGTT-TATATAAGCGTAATTTACATAT
CECVspike AATTGACATCATATATATTTGTTTACAAATGTGACGCTCTCTATAGCGTCAAGC

CRCVspike GATGTGA-ATGCTGATTTTGTATTCATTTTATCAGAAAGTGTGACTTT---TTA
CECVspike ACTGCCACATGCGACACAGTGC-TGCATAGTTTACAGAGGTGTTCTAATCTCACCTA

CRCVspike TGCATATTTTACAGACATGGTGTGTTACTAAGTTTCTGTTTCACTGTTTAT-TTAGGCA
CECVspike TTACAGTTTAAATACACCAATGGTCTAA--AAACCTATGAATATGTGAAGATTATGAA

CRCVspike CGGTGCTTT---CACATATAT-TGTCATGCCCTGACTTGTATAGTGTCTAGACTTTA
CECVspike TATGACATGGCTACGCCCTACATCTTTTCCGCCACTGTGGGAGGTTACATACCTGAT

CRCVspike GAATCTGGGTTA---CACCTCTCCTTTTAAACAAATTTACTCGCTTCAATCAAG
CECVspike GGATTTAGTTTAAACAAATGGTGTGTTTTCATCAACAGCTCCACTTTTGTAGTGGCAGA

CRCVspike ATGGTGTATTTTATGCTGTTTATGTTAGAGTGAATTTTATGAGTGAGATTAGTGT-
CECVspike TTTGTAAACAAATCAACATTTATTTAGTTTATGCTGTTGAGCAGTCTCTAGTTTGGTGT

CRCVspike ---AAACACTATCTATGACCACTACTGCTGTTTATGAATTAACGGTTACACTGTT
CECVspike GCAGCAGAGAAATTTGTTTGAAGGTGACAGTTTACGCAATTAATGGTGTGTTTTTA

CRCVspike AGCCA-ATTGACAGTGTACCAGCTATACCTATCTTCCG--ATTGTAAATAGAGG
CECVspike AATGACAGTGAATGATTAAGATTAACCTTAATTTTACTGAGATGTACATCTGGC

【図 8】

FIGURE 8 (Page 1 of 9)

CRCVspike -----ATGTTTTGATACITTTA-----ATTCCCTACCAATG
CECVspike ATGATTTGCTGCTGATCTGCAATTTTATGTTATGTTTACACACATGCTTTCAGTACG

CRCVspike GCTTTGCTG-TTATAGGAGATTAAAGTGTACTACGGTTT-CATCATGATGTTGACA
CECVspike TCAATAATGATTGTAGACAATTA--CGTACACAATTAGATGGCAATGAACCTCA

CRCVspike CCGGTG-CTCCTTCTATAGCAGTATGTTGCGATGTTACTAATGTTTAGGTACTTAT
CECVspike TTAGAGACTTTTGTTCAAAACCTT-TAAGAGSAGSAGTGTAGTTGTTGTTGTTAC

CRCVspike TATGTTTTAGA---TCGTGG--TATTTAAATACATA---TGTGTTCTAATGTTTA
CECVspike TACCTACAGAGGTTGGTATACTGTTCTAGAACACCAACTACTGCTTA-TGATA

CRCVspike TTATCTACTTCAAGTTCTACATATCGAATATGGA-CTGAAGGAACTTTACTATTGA
CECVspike TTTCAATATATACAGCAATTTATTTTGTATGGAAGCAATGGAGATAGTACTGTAA

CRCVspike -GCACACTATGG-TTAAACCACCAATTCCTTCTGATTTATGATGGTGTTTTGTCAA
CECVspike TGCAGCTGGTAAACCTTATTTATTTCACTGTTTGTGAGCTGTTAGTGTCAATATA

CRCVspike GGTAAAAATACCAAGGTTATTAAGATGCTGTAGTGTATG---TGAGTTTCTGCTAT
CECVspike CATATCTTATAGATGATGTGCAACATAGGCCCTTTTAAACACGAGTATGTTGCAAT

CRCVspike AACTATAGGTAGTACTTTT---TA-AATACATCTTATAGTGGTATGACACACATAC
CECVspike AACTGAAGTGGCACATGACATTAACAGTTTACACAGTA-GCCAGTGGAAATTCATAT

CRCVspike -TACTAATTTAGATAATAAATACAGGCTCTTTAGAGATCTCTGTTTGGCAGTATATA
CECVspike GTACGGGTATGACAGAAATTCCTT-TCTCTGTCAATGCCAGCAATGGACAAAA

FIGURE 8 (Page 3 of 9)

CRCVspike CTGGCTTAATGATAGT-CGGTGCCTTCTCAATTAATGGGAAGTAAAGCTTTTCA
CECVspike ATGGGTGCTACAGTATTTTCACTGAATACACAGGTGTTGCAATCTTGAGATTCTT--

CRCVspike AATTGATATTTAATATGACAGCTGATGCTTTTATCAGGCTGACTGTTTACTTGT
CECVspike -GTTAATATGATATGAGCGAGTCAAGTTTCTACAGTATGTTGA--AAATCCCTTC

CRCVspike AATAATATGATGCTGCTAGATATAGGATGTTGTTTTC--GCATACTATAGATA
CECVspike GGGGTACTGATGG-ACCGGTAT-TGTATGCTCTTATATGGCACGCTCTTAAGT

CRCVspike AGTTTGCTA---TACCAATGTAGGAGGTTGACCTACAAATGGCAATTTGGGCTATT
CECVspike ATTTGGCAATTACCCCTAGTGTCAAG--AAATGCTATTAG-TAAGTGGGCAAT

CRCVspike TGCAGTCTTTTACTATAGAAATGATACAGTGTGCAAGTTGCTATGTTATATAAT
CECVspike TTTATATTAATGTTTACAAATTTCTTAGCACTTTTCTATGATGTTATATCTTTAACT

CRCVspike TACCTGCTAGTATGTTCTATAGCAGGTTTAACTCTTCTATTTGGAAATA--GGGATT
CECVspike TAACCACTGGTATAGTGGAGCAATTTGGCAATCTTACACATCTACACTGAGCAT

CRCVspike TGGTTTA-CAGAACATCTGTTTAAAGCT-CAAGCTGAGGTGTTTACTGATCAT
CECVspike TAGTACAGTTGAAACACAGCCATTAAAGGTGAGCTATTGTACAGTCAAC-ATTAA

CRCVspike GATGTTGTTTATGCACACATTTGTTTAAAGCTTCCCAAAATTTCTGTCG---TGTA
CECVspike AACATCAATGTTCTCACTTCTGCTAAATTTGCAAAATGGCTTTTATCTGTTGCTTCA

CRCVspike AATTGAATGGTCTTTGTTGTTAGTATGTTGTTGTA--TAGATGCTGTTTATAA--
CECVspike AGTGAAGTGGTCTTGTATAGAGGTGTTGTTTACTACCTAGTTTCTATTCACATACC

FIGURE 8 (Page 5 of 9)

[illegible]

FIGURE 8 (Page 7 of 9)

```

CRCVspike      TACCTTAATGCGATTAAACAAGTGGCCTTGTATGCTATT-----CAGGAAGGGTIT
CECVspike      CCTGGCTAATGCTTCACACCAAGCATTTGGTACATACACAGGCATTTGTAAGATGTTAA
              *   *****   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

CRCVspike      TGATGCTA-----CCAATTCTGCT-----TTAGTTAAATAT
CECVspike      TGATGCTATACATCAAACATCACAGGCTCTGCCACTGTGTCTAARASCATTGGCAAGAGT
              ++++++++          ***   *   ****

CRCVspike      TCABSGCTGTTGTTAATGCAAATGCTGAAGCTCTTAATRACTTATTGCGAACACTCTCTAA
CECVspike      GCABAAGTGTCTGTATACACCAAGGGCAGCTTTAGCGCAACTACAGTACACTGTACAAA
              +---+   +*****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

CRCVspike      TAATTTTGGTGCTATRAGTGCTCTTTACAGAATACTATCTAGACTTGATGCTCTTGA
CECVspike      TAGCTTCCBAGCTCATATAGTAGTCTTATTAGTGCAATTTATATAGAGTCAAGCTAGAG
              **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

CRCVspike      AGOOCAGSCTCAGTAGACAGACTTATCAATGGCGCTTTACCCTCTTAAATGCTATTGT
CECVspike      TGCCTGATGCACAGTGTATAGGCTGATTACAGGTAGACTACAGCACTTAATGCATTGT
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

CRCVspike      TTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATATTAGTSCAGSACAAGCTATGGAGAA
CECVspike      ATCTCAGACTCTAACCAACAGACGGAGGTTAGGCGTAGTACAGACTTGCCAAAGACAA
              +*****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

CRCVspike      GGTTAATGAATGCTGCBAAGGCCAATCATCTAGGANAATTTTTGTGGTAATGTAATACA
CECVspike      GGGTAAGAAAGTGTTAGTGTCTCAGCTCGCAGAGATTGGATTTTGTGGTAATGTAATACA
              +*****++*****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

CRCVspike      TATTATATCATTAGTGCGAAGTGCCTCAATATGGTTTGTATTTTATCCACTTTCAGTAGT
CECVspike      TTGTGTTTCACTTGCAAATGCAGCACAATGGCAATGGTTTCTTCCACAGCTGCTAT-
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

CRCVspike      TCCCTACTAAGTATGTCACTGCGAAGATTAGTCGCGCTCTGTGCATYGCAGGTATAGAG
CECVspike      TACCACAGCTCTTAAGACTCTAACACTTGTGCAGTATTGTGCTTCAGATGGSGATC
              *..*..*   +*****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

【図 9】

BCVspike
HCVspike
CRCVspike
HEVspike

ATGTTTGTGACTCTTTAAATTCCTACCAATGGCTCTGTCTGTATAG
-----ATGCTTTGTGACTCTTTAAATTCCTACCAAGCGTTTCTGTCTGTATAG
-----ATGCTTTGTGACTCTTTAAATTCCTACCAAGCGTTTCTGTCTGTATAG
-----ATGTTTGTAACTCTTTAAATCAACCGTCGCTCTGTCTGTAGCATATAG

BCVspike
HCVspike
CRCVspike
HEVspike

GAGATTAAAGTGCTACTACGGTTCCAAATTAAGATGTTGACACGGGTGTCTCTCTCTGTA
GAGATTAAAGTGCTACTACGGTTCCAAATTAAGATGTTGACACGGGTGTCTCTCTCTGTA
GAGATTAAAGTGCTACTACGGTTCCAAATTAAGATGTTGACACGGGTGTCTCTCTCTGTA
GAGATTAAAGTGCTACTACTATCATCAATTAAGAGCTTGACACTGGGTGTGCACCTATTA
* ****

BCVspike
HCVspike
CRCVspike
HEVspike

GCACGTACTCTGTGATGTACTAAATGGTTAGAGCTATATATGTTTTAGATCGTGTGT
GCACGTACTCTGTGATGTACTAAATGGTTAGAGCTATATATGTTTTAGATCGTGTGT
GCACGTACTCTGTGATGTACTAAATGGTTAGAGCTATATATGTTTTAGATCGTGTGT
GCCTCTAGATGTTTGTGATGTACTAAATGGTTTGGGAGCTTATATGTTTTAGATCGTGTCT

BCVspike
HCVspike
CRCVspike
HEVspike

ATTTAAATCTACGTTTGTCTTAATGGTTACCTACTACAGGTTCTACATATCGTA
ATTTAAATCTACGTTTGTCTTAATGGTTACCTACTACAGGTTCTACATATCGTA
ATTTAAATCTACATGTGTCTTAATGGTTATTATTAATCTACTACAGGTTCTACATATCGTA
ATTTAAATACCACTATGTTGCTCAATGGTTATTACCAATCTACAGGTTCTACATATCGTA

BCVspike
HCVspike
CRCVspike
HEVspike

ATATGGCACTGAGGGAACCTTACTATTGACGACACTATGGTTTAAACCACTTTCTTT
ATATGGCACTGAGGGAACCTTACTATTGACGACACTATGGTTTAAACCACTTTCTTT
ATATGGCACTGAGGGAACCTTACTATTGACGACACTATGGTTTAAACCACTTTCTTT
ATATGGCTCTGAAGGAACCTGATTATTGAGCACTTGTGGTTTAAACCGCGCTTTTATAT

BCVspike
HCVspike
CRCVspike
HEVspike

CTGATTTTATATATGATTTTGTCTAAGGTCAAAATACCAAGGTATTATAAAATGGTG
CTGATTTTATATATGATTTTGTCTAAGGTCAAAATACCAAGGTATTATAAAATGGTG
CTGATTTTATATGATTTTGTCTAAGGTCAAAATACCAAGGTATTATAAAATGGTG
CACCTTTATATGATGTTATTTTGGCAGGTATAAACACGAGATTATTCATCAATGGTG

FIGURE 9 (Page 3 of 12)

```

BCVspike      ATTTAGGCACGGTGCCTTCACATATTATGTCATGCCCTTGACTTGTAATAGTGCTATGA
HCVspike      ATTTAGGCACGGTGCCTTCACATATTATGTCCTCGCTTGCATTGTAATAGTGCTATGA
CRVspike      ATTTAGGCACGGTGCCTTCACATATTATGTCATGCCCTTGACTTGTAATAGTGCTATGA
HEVspike      ATTTAGGCACCTTGTGTCACACATATTATGTTATGCCCATTGACTTGTTAGTAGAGCTTTAT
*****
BCVspike      CTTTAGAATATTGGGTACACCTCTCACTCTTAACCAATATTTACTCGCTTTCAAATCAAG
HCVspike      CTTTAGAATATTGGGTACACCTCTCACTCTTAACCAATATTTACTAGCTTTCAAATCAAG
CRVspike      CTTTAGAATATTGGGTACACCTCTCACTCTTAAACCAATATTTACTCGCTTTCAAATCAAG
HEVspike      CTTTAGAATATTGGGTACACCTCTCACTCTACTAGCAATATTCTCTAGCTTTGACCAGG
*****
BCVspike      ATGGGTGTTATTTTAATGCTGTGATTGCTAAGAGTGATTTTATGAGTGAGATTAAGTGTA
HCVspike      ATGGGTGTTATTTTAATGCTGTGATTGCTAAGAGTGATTTTATGAGTGAGATTAAGTGTA
CRVspike      ATGGGTGTTATTTTAATGCTGTGATTGCTAAGAGTGATTTTATGAGTGAGATTAAGTGTA
HEVspike      ATGGGTGTTTATACCACTGCTGTGATTGCTGATGATTTATGAGTGAGATTAAGTGTA
*****
BCVspike      AATCACTATCTATAGCAACCTACTCGGTGTTATGAATTAAGCGCTTACACTGTTACAG
HCVspike      AATCACTATCTATAGCAACCTACTACTGGTGTTATGAATTAAGCGCTTACACTGTTACAG
CRVspike      AATCACTATCTATAGCAACCTACTCGGTGTTATGAATTAAGCGCTTACACTGTTACAG
HEVspike      AATCTTCTCAATTACACCACCTACTGGTCTTATGAACCTAAGCGCTTACACGTTACAC
*****
BCVspike      CAATTGCAGATGTTTACCGAGCTACTACTACTCTCCCGATTGTAATATAGAGCGTTGGC
HCVspike      CAATTGCAGATGTTTACCGAGCTACTACTACTCTCCCGATTGTAATATAGAGCGTTGGC
CRVspike      CAATTGCAGATGTTTACCGAGCTACTACTACTCTCCCGATTGTAATATAGAGCGTTGGC
HEVspike      CTGTGTCGCTGTGATCTAGAGTAACCTGACTTACCACCTGCGATATGAGCTTGACG
*****
BCVspike      TTATGATAGTCTGTGSCCTCTCATTAATTTGGGAAGCTAGACCTTTTCAAATGTGA
HCVspike      TTATGATAGTCTGTGSCCTCTCATTAATTTGGGAAGCTAGACCTTTTCAAATGTGA
CRVspike      TTATGATAGTCTGTGSCCTCTCATTAATTTGGGAAGCTAGACCTTTTCAAATGTGA
HEVspike      TTATGATAGACGCTTCTGCGCTCTCATTAATTTGGGAAGCTAAATTTTCTAATGTGA
*****

```

FIGURE 9 (Page 4 of 12)

BCVspike ATTTTAATATGAGCAGCTGATGCTTTTATTCAGGCAGACTCATTTACTTGTAAATAATA
 HCVspike ATTTTAATATGAGCAGCTGATGCTTTTATTCAGGCAGACTCATTTACTTGTAAATAATA
 CRCVspike ATTTTAATATGAGCAGCTGATGCTTTTATTCAGGCAGACTCATTTACTTGTAAATAATA
 HEVspike ATTTTAACATGGGAGGCTGATGCTTTTATTCAGGCAGACTCATTTGGTGTAAACAATA
 ***** ** **** ***** ** ** **

BCVspike TTGATCGCAGCTAAGATATATGATGCTTTTCCAGCATAACTATAGATAAGTTTGTCTA
 HCVspike TTGATCGCTGATGATATATGATGCTTTTCCAGCATAACTATAGATAAGTTTGTCTA
 CRCVspike TTGATCGCTGATGATATATGATGCTTTTCCAGCATAACTATAGATAAGTTTGTCTA
 HEVspike TTGATCGCTGCTTATATGATGCTTTTGGTAGCATTAATTTGACAGTTTGTCTA
 ***** ** **** ***** ** ** **

BCVspike TAACCAATGGTAGGAGGCTGACCTACAATGGGCAATTTGGGCTATTTGCAGCTCTTTTA
 HCVspike TAACCAATGGTAGGAGGCTGACCTACAATGGGCAATTTGGGCTATTTGCAGCTCTTTTA
 CRCVspike TAACCAATGGTAGGAGGCTGACCTACAATGGGCAATTTGGGCTATTTGCAGCTCTTTTA
 HEVspike TAACCAATGATGAGAGGTTGATCTGCAATGGGTAATCTGGTATTTACATCACTTTTAA
 ***** ** **** ***** ** ** **

BCVspike ACTATAGAAATGATACACTGCTACAGATGCTGATTTATTAATTTACCTGCTGCTA
 HCVspike ACTATAGAAATGATACACTGCTACAGATGCTGATTTATTAATTTACCTGCTGCTA
 CRCVspike ACTATAGAAATGATACACTGCTACAGATGCTGATTTATTAATTTACCTGCTGCTA
 HEVspike ATTAATAGATTTGACACTGCTGATGAGTTGTCACTCTATATATAGTTTGGCTGACAGAA
 * **** ** **** ***** ** **** **

BCVspike ATGTTCTCTGTAGCAGGTTTAACTCTTCTACTTGGAAATGGAGATTTGGTTTACAGAAC
 HCVspike ATGTTCTCTGTAGCAGGTTTAACTCTTCTACTTGGAAATGGAGATTTGGTTTACAGAAC
 CRCVspike ATGTTCTCTGTAGCAGGTTTAACTCTTCTACTTGGAAATGGAGATTTGGTTTACAGAAC
 HEVspike ACCTATCTGTCACTCAATTAATCACTTCACTTGGAAATGGAGATTTGGTTTAT----T
 * **** ** **** ***** ** **** **

BCVspike AATCTGTTTAAAGCCTCAACCTGTAGGTTTAACTGATCATGATGTTGTTATGACAC
 HCVspike AATCTGTTTAAAGCCTCAACCTGTAGGTTTAACTGATCATGATGTTGTTATGACAC
 CRCVspike AATCTGTTTAAAGCCTCAACCTGTAGGTTTAACTGATCATGATGTTGTTATGACAC
 HEVspike AATCAGAGTTTGTGTTCCAG----AGGC-CTT-----CATGATGCTGATATTCAC
 ***** ** **** ***** ** **** **

FIGURE 9 (Page 6 of 12)

BCVspike GGTGTAAATATCTTGTCTAATTTTATTTGATGATGTTAATAGTGGTACTACTTGTCTTA
 HCVspike GGTGTAAATATTTTGTCTAATTTTATTTGATGATGTTAATAGTGGTACTACTTGTCTTA
 CRCVspike GGTGTAAATATTTTGTCTAATTTTATTTGATGATGTTAATAGTGGTACTACTTGTCTTA
 HEVspike GGTGTAAATATTTTGTCTAATTTTATTTGATGATGTTAATAGTGGTACTACTTGTCTTA
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike CTGATTTACAAAATCAACACAGACATAATTTCTGGTGTGTTGTTAATATGATCTTT
 HCVspike CTGATTTACAAAATCAACACAGACATAATTTCTGGTGTGTTGTTAATATGATCTTT
 CRCVspike CTGATTTACAAAATCAACACAGACATAATTTCTGGTGTGTTGTTAATATGATCTTT
 HEVspike CTGATTTACAAACAGGTAATATACTACTACTGATGTTGTTGTTAATATGATCTTT
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike ATGGTATTACAGGCCAGGTAATTTTGTGAGGTTAATGCGACTTATTAATATAGTTGGC
 HCVspike ATGGTATTACAGGCCAGGTAATTTTGTGAGGTTAATGCGACTTATTAATATAGTTGGC
 CRCVspike ATGGTATTACAGGCCAGGTAATTTTGTGAGGTTAATGCGACTTATTAATATAGTTGGC
 HEVspike ATGGCATTACAGGCCAGGTAATTTATAGAGTTAATGCGACTTATTAATATAGTTGGC
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike AGAACCCTTTATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTATAGACTACTTAAACAACA
 HCVspike AGAACCCTTTATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTATAGACTACTTAAACAACA
 CRCVspike AGAACCCTTTATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTATAGACTACTTAAACAACA
 HEVspike AGAACCCTTTATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTATAGACTACTTAAACAACA
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike GAACTTTTATGATCTGATGCTATAGCGGCTGTTTTCAGCGGCTTTTATGCTAATTT
 HCVspike GAACTTTTATGATCTGATGCTATAGCGGCTGTTTTCAGCGGCTTTTATGCTAATTT
 CRCVspike GAACTTTTATGATCTGATGCTATAGCGGCTGTTTTCAGCGGCTTTTATGCTAATTT
 HEVspike GAACTTTTATGATCTGATGCTATAGCGGCTGTTTTCAGCGGCTTTTATGCTAATTT
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike CTTCGAAACAGCATTTGCTATTTGGAAATATTAATGCAATACGTTTAAATATACCTC
 HCVspike CTTCGAAACAGCATTTGCTATTTGGAAATATTAATGCAATACGTTTAAATATACCTC
 CRCVspike CTTCGAAACAGCATTTGCTATTTGGAAATATTAATGCAATACGTTTAAATATACCTC
 HEVspike CTTCGAAACAGCATTTGCTATTTGGAAATATTAATGCAATACGTTTAAATATACCTC
 ***** ** **** ***** ** **** **

FIGURE 9 (Page 5 of 12)

BCVspike AACATGTTTAAAGCTCCACAAATTTCTCGCTGTAATTTGGATGGGCTTTTGTGTG
 HCVspike AACATGTTTAAAGCTCCACAAATTTCTCGCTGTAATTTGGATGGGCTTTTGTGTG
 CRCVspike AACATGTTTAAAGCTCCACAAATTTCTCGCTGTAATTTGGATGGGCTTTTGTGTG
 HEVspike AGCAATGTTTAAATACCTAATACATATTTCTGTA----GACACAGCT--AATGCA
 * * ***** * * * * * ***** ** * * * *

BCVspike TAGGTAGTGGTCTCGTATAGATGCTGTTTAAATAATAGTGTATAGGACTTTGCTCTG
 HCVspike TAGGTAGTGGTCTCGTATAGATGCTGTTTAAATAATAGTGTATAGGACTTTGCTCTG
 CRCVspike TAGGTAGTGGTCTCGTATAGATGCTGTTTAAATAATAGTGTATAGGACTTTGCTCTG
 HEVspike TAGGTGGTG---CTGGCACAGGACTTTGCTGTTAGGACCACTGCTGGCAGGTTTGTG
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike CAGGTACTAATTTTAACTTGTCAATGCTGCCAATGTAATTTGTTGCTGCTCCAG
 HCVspike CAGGTACTAATTTTAACTTGTCAATGCTGCCAATGTAATTTGTTGCTGCTCCAG
 CRCVspike CAGGTACTAATTTTAACTTGTCAATGCTGCCAATGTAATTTGTTGCTGCTCCAG
 HEVspike CTG---C-AGTTAC--A-----AACGCTACTAGTGTACTTGTGTTGCTCAACCCAG
 *

BCVspike ACCCAATACATCTAATCTACAGGGCTTATAAGTGGCCCAAACTAATATTTAGTGTG
 HCVspike ACCCAATACATCTAATCTACAGGGCTTATAAGTGGCCCAAACTAATATTTAGTGTG
 CRCVspike ACCCAATATTTATCTAATCTACAGGGCTTATAAGTGGCCCAAACTAATATTTAGTGTG
 HEVspike ATCCCTCCACATATAAGGTGTAAATGCTGGACTTGTGCCAATCTAAGATTTCTATAC
 * ** ** **** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

BCVspike GCATAGGTGAGCACTGTTGGGCTTGTCTATTAAGATGATTTTGTGGAGTATCTCT
 HCVspike GCATAGGTGAGCACTGTTGGGCTTGTCTATTAAGATGATTTTGTGGAGTATCTCT
 CRCVspike GCATAGGTGAGCACTGTTGGGCTTGTCTATTAAGATGATTTTGTGGAGTATCTCT
 HEVspike AACCAAGGTGAGCACTGTTGGGCTTGTCTATTAAGATGATTTTGTGGAGTATCTCT
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike GTACTTGCCAAACCAAGCACTTTTGGGTTGCTGTTGTTGATCTTTTACAAAGGGATA
 HCVspike GTACTTGCCAAACCAAGCACTTTTGGGTTGCTGTTGTTGATCTTTTACAAAGGGATA
 CRCVspike GTACTTGCCAAACCAAGCACTTTTGGGTTGCTGTTGTTGATCTTTTACAAAGGGATA
 HEVspike GCACCTGTAACCAAGGCTTTTACAGCTGGGCTGAGAACTTTTGTGCAATAGGTA
 * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

FIGURE 9 (Page 7 of 12)

BCVspike TTTCAGGACAGCTGCAACCTATTAACTATTTGATAGTATCTTGGTTGTGTTGCAATG
 HCVspike TTTCAGGACAGCTGCAACCTATTAACTATTTGATAGTATCTTGGTTGTGTTGCAATG
 CRCVspike TTTCAGGACAGCTGCAACCTATTAACTATTTGATAGTATCTTGGTTGTGTTGCAATG
 HEVspike TTTCAGGACAAATACAGCTTGTATATTTTGTAGATATCTTGGTTGTGTTGCAATG
 *

BCVspike CTGATAATAGTACTTCTAGTCTGTTCAACATGATCTACAGAGTGTAGTGGTACT
 HCVspike CTGATAATAGTACTTCTAGTCTGTTCAACATGATCTACAGAGTGTAGTGGTACT
 CRCVspike CTGATAATAGTACTTCTAGTCTGTTCAACATGATCTACAGAGTGTAGTGGTACT
 HEVspike CTATATAATAGTACTGCTGATGATCTGTTGATTTACCGCTTGTAGGAGGCTATT
 *

BCVspike GTGGGATTTACTCTACAAAAGCAGGCTGTAGAGGATTTACCACTGTTATCGGTTTA
 HCVspike GTGGGATTTACTCTACAAAAGCAGGCTGTAGAGGATTTACCACTGTTATCGGTTTA
 CRCVspike GTGGGATTTACTCTACAAAAGCAGGCTGTAGAGGATTTACCACTGTTATCGGTTTA
 HEVspike GTGTGATTTATGTTACAGCACTTATGATCAGTATGATCTTTACTACAGGTTATCGGTTTA
 *

BCVspike CTAAATTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAATGATAGTTTAGAACCTGTAGTGGTT
 HCVspike CTAAATTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAATGATAGTTTAGAACCTGTAGTGGTT
 CRCVspike CTAAATTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAATGATAGTTTAGAACCTGTAGTGGTT
 HEVspike CTAAATTTGAGCCATTTGCGGCTAATTTGTAATGATAGTATAGAACCTGTAGTGGTT
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike TGTATGAATTCRAATACCTTCAGAGTTTACTATAGGTATATGAGGAGTTTATTCAAA
 HCVspike TGTATGAATTCRAATACCTTCAGAGTTTACTATAGGTATATGAGGAGTTTATTCAAA
 CRCVspike TGTATGAATTCRAATACCTTCAGAGTTTACTATAGGTATATGAGGAGTTTATTCAAA
 HEVspike TGTATGAATTCRAATACCTTCAGAGTTTACTATAGGTATATGAGGAGTTTATTCAAA
 ***** ** **** ***** ** **** **

BCVspike TAACTCTCTTAAAGTACTATTTGATTTCTGCTTTTGTCTGTTGATTTAGCAGCAT
 HCVspike TAACTCTCTTAAAGTACTATTTGATTTCTGCTTTTGTCTGTTGATTTAGCAGCAT
 CRCVspike TAACTCTCTTAAAGTACTATTTGATTTCTGCTTTTGTCTGTTGATTTAGCAGCAT
 HEVspike TAACTCTCTTAAAGTACTATTTGATTTCTGCTTTTGTCTGTTGATTTAGCAGCAT
 *

FIGURE 9 (Page 8 of 12)

BCVspike GTAAATCAGATTGGTGAATATGGTAGTTCTGTGACAAATTAATGCTATCTACAG
 HCVspike GTAAATCAGATTGGTGAATATGGTAGTTCTGTGACAAATTAATGCTATCTACAG
 CRCVspike GTAAATCAGATTGGTGAATATGGTAGTTCTGTGACAAATTAATGCTATCTACAG
 HEVspike GTAGACACAGATTAGCTAGTATGGTAGTTTGTGACAAATTAATGCTATCTACAG
 * * * * *

BCVspike AAGTAATGAACACTTGACACTACAGATTGCAAGTAGCTAATAGTTAATGAATGGTG
 HCVspike AAGTAATGAACACTTGACACTACAGATTGCAAGTAGCTAATAGTTAATGAATGGTG
 CRCVspike AAGTAATGAACACTTGACACTACAGATTGCAAGTAGCTAATAGTTAATGAATGGTG
 HEVspike AAGTAATGAACACTTGACACTACAGATTGCAAGTAGCTAATAGTTAATGAATGGTG
 * * * * *

BCVspike TCACTCTTAGCAGCTAAGCTTAAGATGGCTTAATTTCAATGTAGACGACATCAATTTT
 HCVspike TCACTCTTAGCAGCTAAGCTTAAGATGGCTTAATTTCAATGTAGACGACATCAATTTT
 CRCVspike TCACTCTTAGCAGCTAAGCTTAAGATGGCTTAATTTCAATGTAGACGACATCAATTTT
 HEVspike TCACCCCTTAGCTAAGATGAAGTAGGATTAATTTCAATGTAGACGATCAACTTCT
 * * * * *

BCVspike CCCCTGATTAGGTTGTTTAGGAAGGATGTAATGAAGTTCCAGTAGATCTGCTATAG
 HCVspike CCCCTGATTAGGTTGTTTAGGAAGGATGTAATGAAGTTCCAGTAGATCTGCTATAG
 CRCVspike CCCCTGATTAGGTTGTTTAGGAAGGATGTAATGAAGTTCCAGTAGATCTGCTATAG
 HEVspike CCTCTGATTAGGTTGTTTAGGAAGGATGTAATGAAGTTCCAGTAGATCTGCTATAG
 * * * * *

BCVspike AGGATTACTTTTTCTAAGTAAGATTATCTGATGCGTTTGTGAGGCTTATAATA
 HCVspike AGGATTACTTTTTCTAAGTAAGATTATCTGATGCGTTTGTGAGGCTTATAATA
 CRCVspike AGGATTACTTTTTCTAAGTAAGATTATCTGATGCGTTTGTGAGGCTTATAATA
 HEVspike AGGATTACTTTTTCTAAGTAAGATTATCTGATGCGTTTGTGAGGCTTATAATA
 * * * * *

BCVspike ATTGTACTGGAGGTCGCGAAATTAGGAGCTCAATTTGTGTGCAAAAGTATATGGTATCA
 HCVspike ATTGTACTGGAGGTCGCGAAATTAGGAGCTCAATTTGTGTGCAAAAGTATATGGTATCA
 CRCVspike ATTGTACTGGAGGTCGCGAAATTAGGAGCTCAATTTGTGTGCAAAAGTATATGGTATCA
 HEVspike ACTGCACTGGAGGTCGCGAAATTAGGAGCTCAATTTGTGTGCAAAAGTATATGGTATCA
 * * * * *

FIGURE 9 (Page 9 of 12)

BCVspike AAGTGTGGCTCCACTACTCTCAGAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCTACCT
 HCVspike AAGTGTGGCTCCACTACTCTCAGTAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCTACCT
 CRCVspike AAGTGTGGCTCCACTACTCTCAGAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCTACCT
 HEVspike AAGTGTGGCTCCACTTTGTTATCTGAATTCAGATGATGGTTACACTTTGGCTGCTACCG
 * * * * *

BCVspike CTGCTAGCTCTGTTTCCCTCTTGGTCAGCAGCAGCGGATACACTTTTATTAATGTTTC
 HCVspike CTGCTAGCTCTGTTTCCCTCTTGGTCAGCAGCAGCGGATACACTTTTATTAATGTTTC
 CRCVspike TTGCTAGCTCTGTTTCCCTCTTGGTCAGCAGCAGCGGATACACTTTTATTAATGTTTC
 HEVspike CTGCTAGCTCTTTCCTCTTGGTCAGCAGCTGCAAGCTGATACACTTTTATTAATGTTTC
 * * * * *

BCVspike AGTATCGTATTATAGGATGGTGTACCATGATGTTCTAAGTCAAAATCAAAAGCTTA
 HCVspike AGTATCGTATTATAGGATGGTGTACCATGATGTTCTAAGTCAAAATCAAAAGCTTA
 CRCVspike AGTATCGTATTATAGGATGGTGTACCATGATGTTCTAAGTCAAAATCAAAAGCTTA
 HEVspike AGTATCGTATAAATGGGCTTGGCTCAGCATGATGTTCTAAGTCAAAATCAAAAGCTTA
 * * * * *

BCVspike TTGCTAATGCATTAAACATGCTGTGATGCTATTGAGGAGGTTTGTAGCTACCAAT
 HCVspike TTGCTAATGCATTAAACATGCTGTGATGCTATTGAGGAGGTTTGTAGCTACCAAT
 CRCVspike TTCTAATGCATTAAACATGCTGTGATGCTATTGAGGAGGTTTGTAGCTACCAAT
 HEVspike TTGCTAGTGCATTAAACAGCTCTTGATTTCTACGAGGAGGTTTGTAGCTACCAAT
 * * * * *

BCVspike CTGCTTAGTAAATTCAGCTGTGTTAATCAAAATGCTGAAGCTCTTAATACCTAT
 HCVspike CTGCTTAGTAAATTCAGCTGTGTTAATCAAAATGCTGAAGCTCTTAATACCTAT
 CRCVspike CTGCTTAGTAAATTCAGCTGTGTTAATCAAAATGCTGAAGCTCTTAATACCTAT
 HEVspike CTGCTTAGTAAATTCAGCTGTGTTAATCAAAATGCTGAAGCTCTTAATACCTAT
 * * * * *

BCVspike TGCACCAACTCTCTAATAGATTGGTGTATAGTCTCTTTACAGAAATTCATCTA
 HCVspike TGCACCAACTCTCTAATAGATTGGTGTATAGTCTCTTTACAGAAATTCATCTA
 CRCVspike TGCACCAACTCTCTAATAGATTGGTGTATAGTCTCTTTACAGAAATTCATCTA
 HEVspike TGCACCAACTCTCTAAGATTTGGTGTATAGTCTCTTTACAGAAATTCATCTA
 * * * * *

FIGURE 9 (Page 10 of 12)

BCVspike GACTGTAGTCTCTTGAAGCGCAGCTCAGATAGCAGACTTATTAATGGGCTCTACCG
 HCVspike GACTGTAGTCTCTTGAAGCGCAGCTCAGATAGCAGACTTATTAATGGGCTCTACCG
 CRCVspike GACTGTAGTCTCTTGAAGCGCAGCTCAGATAGCAGACTTATTAATGGGCTCTACCG
 HEVspike GGCTGATGCTCTTGAAGCTAAGCTCAGATAGCAGACTTATTAATGGGCTCTACCG
 * * * * *

BCVspike CTCCTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATTTAGTGCAG
 HCVspike CTCCTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATTTAGTGCAG
 CRCVspike CTCCTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATTTAGTGCAG
 HEVspike CTCCTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATTTAGTGCAG
 * * * * *

BCVspike CACAACTATGGAGAGGTTAATGAATGTCAAAAGCCAAATCATCTAGGATAAATTTT
 HCVspike CACAACTATGGAGAGGTTAATGAATGTCAAAAGCCAAATCATCTAGGATAAATTTT
 CRCVspike CACAACTATGGAGAGGTTAATGAATGTCAAAAGCCAAATCATCTAGGATAAATTTT
 HEVspike CACAACTATGGAGAGGTTAATGAATGTCAAAAGCCAAATCATCTAGGATAAATTTT
 * * * * *

BCVspike GTGGTAATGGTAAATATATATCATTAGTGCAGAAATGCCATAGGTTGTATTTA
 HCVspike GTGGTAATGGTAAATATATATCATTAGTGCAGAAATGCCATAGGTTGTATTTA
 CRCVspike GTGGTAATGGTAAATATATATCATTAGTGCAGAAATGCCATAGGTTGTATTTA
 HEVspike GTGGTAATGGTAAATATATATCATTAGTGCAGAAATGCCATAGGTTGTATTTA
 * * * * *

BCVspike TCCACTTTAGCTATGTCCTACTAAGTATGCTACTGCGAAGGTTAGTCCGGTCTGTGCA
 HCVspike TCCACTTTAGCTATGTCCTACTAAGTATGCTACTGCGAAGGTTAGTCCGGTCTGTGCA
 CRCVspike TCCACTTTAGCTATGTCCTACTAAGTATGCTACTGCGAAGGTTAGTCCGGTCTGTGCA
 HEVspike TCCACTTTAGCTATGTCCTACTAAGTATGCTACTGCGAAGGTTAGTCCGGTCTGTGCA
 * * * * *

BCVspike TTGCTGGTATAGAGGATAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATTAACACT
 HCVspike TTGCTGGTATAGAGGATAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATTAACACT
 CRCVspike TTGCTGGTATAGAGGATAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATTAACACT
 HEVspike TTGCTGGTATAGAGGATAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATTAACACT
 * * * * *

FIGURE 9 (Page 11 of 12)

BCVspike GGATGTTCACTGGTAGTGGTATTACTACCTGAACCTATAACTGGAATTAATGTTGG
 HCVspike GGATGTTCACTGGTAGTGGTATTACTACCTGAACCTATAACTGGAATTAATGTTGG
 CRCVspike GGATGTTCACTGGTAGTGGTATTACTACCTGAACCTATAACTGGAATTAATGTTGG
 HEVspike GGATGTTCACTGGTAGTGGTATTACTACCTGAACCTATAACTGGAATTAATGTTGG
 * * * * *

BCVspike TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATACACTAAAGCAGCGGATGTAATGCTGAACATTTCAA
 HCVspike TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATACACTAAAGCAGCGGATGTAATGCTGAACATTTCAA
 CRCVspike TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATACACTAAAGCAGCGGATGTAATGCTGAACATTTCAA
 HEVspike TGTAGTACCTGTGCTGTTAATACACTAAAGCAGCGGATGTAATGCTGAACATTTCAA
 * * * * *

BCVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAAGCCAAACATCAG
 HCVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAAGCCAAACATCAG
 CRCVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAAGCCAAACATTA
 HEVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAAGCCAAACATCCT
 * * * * *

BCVspike TGGCACAGATTGTGCACTTGATTATATAAATGTACATCTTGGACCTACAAGATGAAA
 HCVspike TGGCACAGATTGTGCACTTGATTATATAAATGTACATCTTGGACCTACAAGATGAAA
 CRCVspike TGGCACAGATTGTGCACTTGATTATATAAATGTACATCTTGGACCTACAAGATGAAA
 HEVspike TGGCACAGATTGTGCACTTGATTATATAAATGTACATCTTGGACCTACAAGATGAAA
 * * * * *

BCVspike TGAATAGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAAGGACA
 HCVspike TGAATAGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAAGGACA
 CRCVspike TGAATAGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAAGGACA
 HEVspike TGAATAGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAAGGACA
 * * * * *

BCVspike TTGGTACATATGAGTATATGTAATAAGGCTTGGTATGATGGCTTTAATGGCTTGG
 HCVspike TTGGTACATATGAGTATATGTAATAAGGCTTGGTATGATGGCTTTAATGGCTTGG
 CRCVspike TTGGTACATATGAGTATATGTAATAAGGCTTGGTATGATGGCTTTAATGGCTTGG
 HEVspike TTGGTACATATGAGTATATGTAATAAGGCTTGGTATGATGGCTTTAATGGCTTGG
 * * * * *

FIGURE 9 (Page 12 of 12)

BCVspike	CTGGTGTAGCTATGCTGTTTACTATCTTCATATGCTGTGTACAGGATGGGACTA
HCVspike	CTGGTGTAGCTATGCTGTTTACTATCTTCATATGCTGTGTACAGGATGGGACTA
CRVspike	CTGGGCTAGCTATGCTGTTTACTATCTTCATATGCTGTGTACAGGATGGGACTA
HEVspike	CTGGTGTAGCTATGCTGTTTACTATCTTCATATGCTGTGTACAGGATGGGACTA
*****	*****
BCVspike	GTTGTTTTAAGAAATGTGGTGTGTGATGATTATAC-----
HCVspike	GTTGTTTTAAGAAATGTGGTGTGTGATGATTATACGGACACAGG-----
CRVspike	GTTGTTTTAAGAAATGTGGTGTGTGATGATTATACGGACATCAGG-----
HEVspike	GTTGTTTTAAGAAATGTGGGTTGTTTGTGATGATTATACGGACACAGGATTTGTAA
*****	*****
BCVspike	-----
HCVspike	-----
CRVspike	-----
HEVspike	TCAAAACTTCACATGACGATTAAATTCCT

【 10 】

FIGURE 10 (Page 1 of 5)

BCVspikepro	----MFLILLISLMALAVIGDLKCTTVSINDVDVGVPSVSTOTVDVNTGLGTYVLDRV
HCVspikepro	----MFLILLISLPTAFVAVIGDLKCTTVSINDVDGAPSTSTDIVDNTGLGTYVLDRV
CRVspikepro	----MFLILLISLMALAVIGDLKCTTVSINDVDGAPSTSTDIVDNTGLGTYVLDRV
HEVspikepro	----MFLILLITLPSVFAVIGDLKCTTVSINDVDGAPSTSSVVDVNTGLGTYVLDRV
CECVspikepro	MIVLVTCILLGLSYSTASTSSNDCAQVWTVQLDQENKLIRDFLQNKSEKGTVVVGG--
*****	*****
BCVspikepro	YIMTLLINGYPTSGSTYRNMLKGTLLSLTWKPPFLSDFINGIFAKVKNTEVING
HCVspikepro	YIMTLLINGYPTSGSTYRNMLKGTLLSLRWKPPFLSDFINGIFAKVKNTEVING
CRVspikepro	YIMTLLINGYPTSGSTYRNMLKGTLLSLTWKPPFLSDFIDGIFAKVKNTEVING
HEVspikepro	YIMTLLINGYPTSGATFRNMLKGTLLSLTWKPPFLSDFIDGIFAKVKNTEVING
CECVspikepro	YIPTEVYMKSRATITAYEYFSNIHAFYFDMENSTENAGRKLLFHVHSGEVS--V
*****	*****
BCVspikepro	VHYSEFPALTIGSTFVNTSYSVVQFPTTMDNLQSLLEISVCQYTMCEYPTICHFNL
HCVspikepro	VHYSEFPALTIGSTFVNTSYSVVQFPTTMDNLQSLLEISVCQYTMCEYPTICHFNL
CRVspikepro	VHYSEFPALTIGSTFVNTSYSVVQFPTTMDNLQSLLEISVCQYTMCEYPTICHFNL
HEVspikepro	VHYSEFPALTIGSTFVNTSYSVVQFPTTMDNLQSLLEISVCQYTMCEYPTICHFNL
CECVspikepro	LIYISTRDDVQHRFLKGLVCITESRNIYN--STSSQWNSICTGDRKIPFVSIFTDN
*****	*****
BCVspikepro	GNRIELMHHDTGVVSLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDTGVVT
HCVspikepro	GNRIELMHHDTGVVSLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDTGVVT
CRVspikepro	GNRIELMHHDTGVVSLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDTGVVT
HEVspikepro	GNRIELMHHDTGVVSLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDTGVVT
CECVspikepro	GTIKYGLEWDEFTAYISGRSTWNINWNNFNWVLLISRSSTATWQHSAAVYQGVSN
*****	*****
BCVspikepro	KFLFNVLGTVLSHYVMP-----LTCNSAMTLEYWVPLTKQYLLAFNODGVIF
HCVspikepro	KFLFNVLGTVLSHYVMP-----LTCNSAMTLEYWVPLTKQYLLAFNODGVIF
CRVspikepro	KFLFNVLGTVLSHYVMP-----LTCNSAMTLEYWVPLTKQYLLAFNODGVIF
HEVspikepro	KFLFKVLGTVLSHYVMP-----LTCNSAMTLEYWVPLTKQYLLAFNODGVIF
CECVspikepro	FTYTKLNNVGLKTYELCEDYEYCTGYATNIFAPTGGYIPDGFSPNWFLLTSSFTVS
*****	*****

FIGURE 10 (Page 2 of 5)

BCVspikepro	NAVDCSKDFMSEIKCKTSLAPSTGVYELAGTVQPIADVYR--IPNLFDCNIEAWLNDK
HCVspikepro	NAVDCSKDFMSEIKCKTSLAPSTGVYELAGTVQPIADVYR--IPNLFDCNIEAWLNDK
CRVspikepro	NAVDCSKDFMSEIKCKTSLAPSTGVYELAGTVQPIADVYR--IPNLFDCNIEAWLNDK
HEVspikepro	NAVDCSKDFMSEIMCKTSSPTTGVYELAGTVQPIADVYR--IPNLFDCNIEAWLNDK
CECVspikepro	GRFVTNGLVNLVNFVPSFQVAAQECFEGAGFSQNGVFNNTVDVIRNLFMTADVQ
*****	*****
BCVspikepro	SVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLSFIQADSFTCN-----NIDAANKYGMCFSSITIDK
HCVspikepro	SVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLSFIQADSFTCN-----NIDAANKYGMCFSSITIDK
CRVspikepro	SVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLSFIQADSFTCN-----NIDAANKYGMCFSSITIDK
HEVspikepro	SVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLSFIQADSFTCN-----NIDAANKYGMCFSSITIDK
CECVspikepro	SGMGATVFSNLTGGCILEISCTNIDYSESSFSYSGIPFQVTDGPRICYLVINGTALRY
*****	*****
BCVspikepro	FAIPNGRKVDLQGLNGLYQSFNYRIOTATSCQLYNNLPAAN--VSISRFNPTWNRFFG
HCVspikepro	FAIPNGRKVDLQGLNGLYQSFNYRIOTATSCQLYNNLPAAN--VSISRFNPTWNRFFG
CRVspikepro	FAIPNGRKVDLQGLNGLYQSFNYRIOTATSCQLYNNLPAAN--VSISRFNPTWNRFFG
HEVspikepro	FAIPNGRKVDLQGLNGLYQSFNYRIOTATSCQLYNNLPAAN--VSISRFNPTWNRFFG
CECVspikepro	FGTLFSPVKRAISKWGFYINGYFSTFIDCISFNLTGDSGAFWTIAITSYTERLV
*****	*****
BCVspikepro	FTEQSVFKPQPVGVTHDQVYAQHCFAKPTNFCPKLGLSLCVGSGGIDAGYKNSGIG
HCVspikepro	FTEQSVFKPQPVGVTHDQVYAQHCFAKPTNFCPKLGLSLCVGSGGIDAGYKNSGIG
CRVspikepro	FTEQSVFKPQPVGVTHDQVYAQHCFAKPTNFCPKLGLSLCVGSGGIDAGYKNSGIG
HEVspikepro	FTEQSVFKPQPVGVTHDQVYAQHCFAKPTNFCPKLGLSLCVGSGGIDAGYKNSGIG
CECVspikepro	QVNTFAIKVYFQNSHINNTKSQLTANLQNGFYFVASSEVGLVKNVSVLLSPYSHTSV
*****	*****
BCVspikepro	TCPAGTNYLTC-----NAAQCCLCTPDPISTKSTGPKCPQTKYLVI GERCSGLAIKS
HCVspikepro	TCPAGTNYLTC-----NAAQCCLCTPDPISTKSTGPKCPQTKYLVI GERCSGLAIKS
CRVspikepro	TCPAGTNYLTC-----NAAQCCLCTPDPISTKSTGPKCPQTKYLVI GERCSGLAIKS
HEVspikepro	TCPAGTNYLTC-----NAAQCCLCTPDPISTKSTGPKCPQTKYLVI GERCSGLAIKS
CECVspikepro	NTIDGLGMSKGGY--QPIASTLSNITLPMQNNVTCPIRSGVSVVHSTCKSSIMON
*****	*****

FIGURE 10 (Page 3 of 5)

BCVspikepro	DYCGGNPTCQPAFLGWSVDSCLQGRCN--IFANFLHGVNSGTTCSLDQKSNITDI
HCVspikepro	DYCGGNPTCQPAFLGWSVDSCLQGRCN--IFANFLHGVNSGTTCSLDQKSNITDI
CRVspikepro	DYCGGNPTCQPAFLGWSVDSCLQGRCN--IFANFLHGVNSGTTCSLDQKSNITDI
HEVspikepro	DYCGGNPTCQPAFLGWSVDSCLQGRCN--IFANFLHGVNSGTTCSLDQKSNITDI
CECVspikepro	WNGQDCTDVLATATVITKGTGCFPSFKANVLTPLKCLSLNPTGANKVDVAARTFNE
*****	*****
BCVspikepro	LGVCVNYDLGTYGQGIPEVFNATYNSHNLQYLDNSGNYGFRDYLNTNRTMIRSCYSG
HCVspikepro	LGVCVNYDLGTYGQGIPEVFNATYNSHNLQYLDNSGNYGFRDYLNTNRTMIRSCYSG
CRVspikepro	LGVCVNYDLGTYGQGIPEVFNATYNSHNLQYLDNSGNYGFRDYLNTNRTMIRSCYSG
HEVspikepro	LGVCVNYDLGTYGQGIPEVFNATYNSHNLQYLDNSGNYGFRDYLNTNRTMIRSCYSG
CECVspikepro	QVRSGLVYIYSEGDMVGVFSDNSGLHDLVSLDSTQYNN--IYRTGVGLIAQNTST
*****	*****
BCVspikepro	RVSAAFHANSSEPALFRNKNYFNNTLSRQLQPIFYDYSGLGVNADNSTSSAVOT
HCVspikepro	RVSAAFHANSSEPALFRNKNYFNNTLSRQLQPIFYDYSGLGVNADNSTSSAVOT
CRVspikepro	RVSAAFHANSSEPALFRNKNYFNNTLSRQLQPIFYDYSGLGVNADNSTSSAVOT
HEVspikepro	RVSAAFHANSSEPALFRNKNYFNNTLSRQLQPIFYDYSGLGVNADNSTSSAVOT
CECVspikepro	ILSGLHYTSLSGDLGFRNVDGVVSYVTPCVDSQAQAVDGAIVGAMTSINSELLGTH
*****	*****
BCVspikepro	CDLTVGSGCYDYSTKRSRAITITGRFTNFEPTVNS-----VNDS
HCVspikepro	CDLTVGSGCYDYSTKRSRAITITGRFTNFEPTVNS-----VNDS
CRVspikepro	CDLTVGSGCYDYSTKRSRAITITGRFTNFEPTVNS-----VNDS
HEVspikepro	CDLTVGSGCYDYSTKRSRAITITGRFTNFEPTVNS-----VNDS
CECVspikepro	WTTTFNFFYYSITNTNTRGTATDSNDVCEPIITYSNIQVCKNGLVFNWTRSDGD
*****	*****
BCVspikepro	LSPVGLYELQIPSEFTIGNMEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEYSGFCDN
HCVspikepro	LSPVGLYELQIPSEFTIGNMEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEYSGFCDN
CRVspikepro	LSPVGLYELQIPSEFTIGNMEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEYSGFCDN
HEVspikepro	LSPVGLYELQIPSEFTIGNMEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEYSGFCDN
CECVspikepro	VQPS--TGNVTPNFTISVQVYIQTWTFVSDICSRVCKNFRNCKLTVQVSAQCT
*****	*****

【図 15】

FIGURE 15 (Page 1 of 2)

```

CRCV  TATCGCAGCCTACTTTTGTATATGACCAATGTTTATATAGGCTCTGCACAACTCTACA
BCV   TATCGCAGCCTACTTTTGTATATGACCAATGTTTATATAGGCTCTGCACAACTCTACA
OC43  TATCGCAGCCTACTTTTGTATATGACCAATGTTTATATAGGCTCTGCACAACTCTACA
HECV  TATCGCAGCCTACTTTTGTATATGACCAATGTTTATATAGGCTCTGCACAACTCTACA
HEV   TATCGCAGCCTACTTTTGTATATGACCAATGTTTATATAGGCTCTGCACAACTCTACA
*****
CRCV  GCTCTTTGTAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAAGCT
BCV   GCTCTTTGTAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAAGCT
OC43  GCTCTTTGTAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAAGCT
HECV  GCTCTTTGTAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAAGCT
HEV   GCTCTTTGTAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAAGCT
*****
CRCV  AATTTCGGGGATTATATTATTAAGGTTGAAGCTGATTCTTATTTGTGAGTTGTGACGAG
BCV   AATTTCGGGGATTATATTATTAAGGTTGAAGCTGATTCTTATTTGTGAGTTGTGACGAG
OC43  AATTTCGGGGATTATATTATTAAGGTTGAAGCTGATTCTTATTTGTGAGTTGTGACGAG
HECV  AATTTCGGGGATTATATTATTAAGGTTGAAGCTGATTCTTATTTGTGAGTTGTGACGAG
HEV   AATTTCGGGGATTATATTATTAAGGTTGAAGCTGATTCTTATTTGTGAGTTGTGACGAG
*****
CRCV  TATATGTAACCACTTTGATTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
BCV   TATATGTAACCACTTTGATTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
OC43  TATATGTAACCACTTTGATTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
HECV  TATATGTAACCACTTTGATTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
HEV   TATATGTAACCACTTTGATTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCAATACAAAGTATTATGAT
*****
CRCV  GATAGTCAATATATTATTTAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTTCAATCTCTACGAA
BCV   GATAGTCAATATATTATTTAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTTCAATCTCTACGAA
OC43  GATAGTCAATATATTATTTAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTTCAATCTCTACGAA
HECV  GATAGTCAATATATTATTTAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTTCAATCTCTACGAA
HEV   GATAGTCAATATATTATTTAATAAGACACTGGTGTTATTTATGGTTCAATCTCTACGAA
*****
CRCV  ACCATTACCACTGGTTTGATTATTTAATTGTCATTATTTACTTTTACCCCTGCTGTAATAT
BCV   ACCATTACCACTGGTTTGATTATTTAATTGTCATTATTTACTTTTACCCCTGCTGTAATAT
OC43  ACCATTACCACTGGTTTGATTATTTAATTGTCATTATTTACTTTTACCCCTGCTGTAATAT
HECV  ACCATTACCACTGGTTTGATTATTTAATTGTCATTATTTACTTTTACCCCTGCTGTAATAT
HEV   ACCATTACCACTGGTTTGATTATTTAATTGTCATTATTTACTTTTACCCCTGCTGTAATAT
*****
CRCV  TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
BCV   TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
OC43  TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
HECV  TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
HEV   TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
*****

```

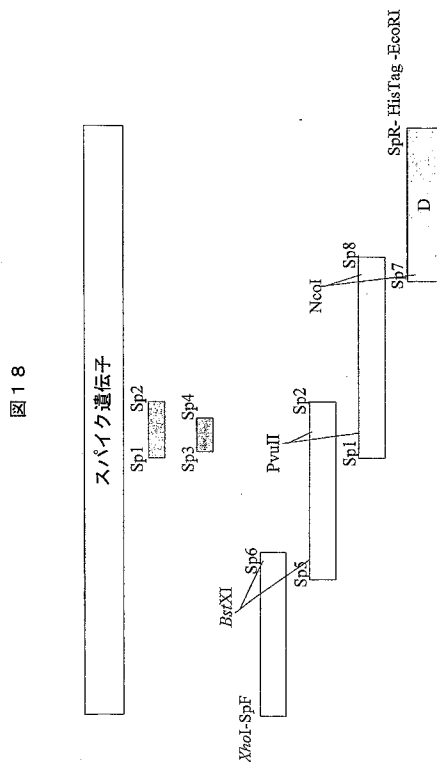
(Page 2 of 2)

```

CRCV  CGTAAGGATTTTACGCCCTGACAGTTGTTGACTCGCGGTGGAACATGCCAGGAGTCT
BCV   CGTAAGGATTTTACGCCCTGACAGTTGTTGACTCGCGGTGGAACATGCCAGGAGTCT
OC43  CGTAAGGATTTTACGCCCTGACAGTTGTTGACTCGCGGTGGAACATGCCAGGAGTCT
HECV  CGTAAGGATTTTACGCCCTGACAGTTGTTGACTCGCGGTGGAACATGCCAGGAGTCT
HEV   CGTAAGGATTTTACGCCCTGACAGTTGTTGACTCGCGGTGGAACATGCCAGGAGTCT
*****
CRCV  GATAACATGACGGCGGT
BCV   GATAACATGACGGCGGT
OC43  GATAACATGACGGCGGT
HECV  GATAACATGACGGCGGT
HEV   GATAACATGACGGCGGT
*****

```

【図 18】



【図 16】

FIGURE 16

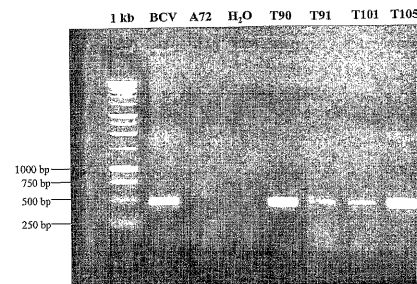
```

CRCV  YRSLTFVNVVYVNGSAQSTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYYKVEADFYLSGCD
BCV   YRSLTFVNVVYVNGSAQSTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYYKVEADFYLSGCD
OC43  YRSLTFVNVVYVNGSAQSTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYYKVEADFYLSGCD
HECV  YRSLTFVNVVYVNGSAQSTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYYKVEADFYLSGCD
HEV   YRSLTFVNVVYVNGSAQSTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYYKVEADFYLSGCD
*****
CRCV  YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFKNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLPLSGNY
BCV   YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFKNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLPLSGNY
OC43  YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFKNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLPLSGNY
HECV  YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFKNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLPLSGNY
HEV   YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFKNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLPLSGNY
*****
CRCV  LAISNELLLTVPTKALCLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
BCV   LAISNELLLTVPTKALCLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
OC43  LAISNELLLTVPTKALCLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
HECV  LAISNELLLTVPTKALCLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
HEV   LAISNELLLTVPTKALCLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
*****

```

【図 17】

FIGURE 17



【配列表】

0004644486000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 Q	1/28	(2006.01)	C 1 2 Q 1/28
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 Q	1/70	(2006.01)	C 1 2 Q 1/70
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/569 L
A 6 1 K	39/215	(2006.01)	A 6 1 K 39/215
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14

- (72)発明者 ブラウンリー, ジョン
イギリス, ハーツ エーエル9 7ティーエー, ハートフィールド, ノース ミムス, ホークスヘッド レーン, ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ
- (72)発明者 チョーカー, ヴィクトリア, ジェーン
イギリス, ハーツ エーエル9 7ティーエー, ハートフィールド, ノース ミムス, ホークスヘッド レーン, ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ
- (72)発明者 エルレス, ケルスティン
イギリス, ハーツ エーエル9 7ティーエー, ハートフィールド, ノース ミムス, ホークスヘッド レーン, ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 Virology, 1991, Vol.183, p.397-404
Virology, 1991年, vol.183, p.397-404

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-14/825
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq